

19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 Übersetzung der  
europäischen Patentschrift

97 EP 0 866 967 B 1

10 DE 696 06 324 T 2

51 Int. Cl. 7:  
G 01 N 33/50  
G 01 N 33/542

21	Deutsches Aktenzeichen:	696 06 324.7
86	PCT-Aktenzeichen:	PCT/US96/18270
96	Europäisches Aktenzeichen:	96 940 448.2
87	PCT-Veröffentlichungs-Nr.:	WO 97/18471
86	PCT-Anmeldetag:	13. 11. 1996
87	Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung:	22. 5. 1997
97	Erstveröffentlichung durch das EPA:	30. 9. 1998
97	Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA:	19. 1. 2000
47	Veröffentlichungstag im Patentblatt:	6. 7. 2000

30 Unionspriorität:  
555691 14. 11. 1995 US

73 Patentinhaber:  
Abbott Laboratories, Abbott Park, Ill., US

74 Vertreter:  
Schieber und Kollegen, 80469 München

84 Benannte Vertragsstaaten:  
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU,  
NL, PT, SE

72 Erfinder:  
FESIK, W., Stephen, Gurnee, US; HAJDUK, J.,  
Philip, Mundelein, US

54 VERWENDUNG VON KERNSPINRESONANZ ZUR AUFFINDUNG VON LIGANDEN FÜR BINDUNGSMOLEKÜLE

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 696 06 324 T 2

DE 696 06 324 T 2

Patentanwalt

Dipl.-Ing. Peter Farago

1928/PAF/ag

EP 96 940 448.2

## VERWENDUNG VON MAGNETISCHER KERNRESONANZ ZUR IDENTIFIZIERUNG VON LIGANDEN FÜR ZIELBIOMOLEKÜLE

### Technisches Gebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren für das Screening von Verbindungen auf biologische Aktivität und für die Bestimmung von Bindungsdissoziationskonstanten unter Anwendung von zweidimensionaler  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  NMR Korrelationsspektralanalyse, um Liganden, die an ein Zielbiomolekül binden, zu identifizieren und zu "designen".

### Hintergrund der Erfindung

Eines der mächtigsten Werkzeuge zur Entdeckung neuer Wirkstoffe ist das auf Zufall basierende Screening von synthetischen chemischen und natürlichen Produktdatenbanken, um Verbindungen ausfindig zu machen, die an ein besonderes Zielmolekül binden (d.h. die Identifizierung von Liganden für das Ziel). Unter Anwendung dieses Verfahrens können Liganden aufgrund ihrer Fähigkeit zur Ausbildung einer physikalischen Assoziation mit einem Zielmolekül oder aufgrund ihrer Fähigkeit zur Veränderung einer Funktion des Zielmoleküls identifiziert werden.

Wenn man von physikalischer Bindung spricht, wird ein Zielmolekül typischerweise einer oder mehreren Verbindungen ausgesetzt, von der/denen man vermutet, daß sie ein Ligand ist, und es werden Assays durchgeführt, um zu bestimmen, ob sich Komplexe zwischen dem Zielmolekül und einer oder mehrerer dieser Verbindungen ausbilden. Diese Assays stellen, wie dem Fachmann geläufig, auf wesentliche Änderungen des Zielmoleküls (beispielsweise Größenänderungen, Ladungsänderungen, Mobilitätsänderungen) ab, die die Komplexbildung anzeigen.

Wenn funktionelle Änderungen gemessen werden, werden

Assaybedingungen eingestellt, die die Messung eines biologischen oder chemischen Ereignissen erlauben, das in Beziehung zu dem Zielmolekül steht (beispielsweise eine enzymkatalysierte Reaktion oder eine rezeptorvermittelte Enzymaktivierung). Zur Identifikation der Veränderung wird die Funktion des Zielmoleküls vor und nach dem Aussetzen mit den Testverbindungen bestimmt.

Existierende physikalische und funktionelle Assays sind erfolgreich verwendet worden, um neue Arzneimittelwirkstoffe zur Verwendung beim "Design" therapeutischer Verbindungen zu identifizieren. Es gibt jedoch solchen Assays innewohnenden Einschränkungen, die deren Genauigkeit, Zuverlässigkeit und Wirksamkeit mindern.

Ein Hauptnachteil der existierenden Assays betrifft das Problem der "falschen Positiven". In einem typischen funktionellen Assay ist ein "falsches Positives" eine Verbindung, auf die der Assay anspricht, wobei diese Verbindung jedoch nicht die gewünschte physiologische Antwort auszulösen vermag. In einem typischen physikalischen Assay ist ein "falsches Positives" eine Verbindung, die beispielsweise an das Ziel bindet, dies jedoch auf eine unspezifische Weise tut (beispielsweise durch nicht-spezifische Bindung). Falsche Positive sind besonders schwierig und problematisch, wenn höhere Konzentrationen an möglichen Liganden gescreent werden, weil viele Verbindungen bei solchen Konzentrationen nicht-spezifische Eigenschaften aufweisen.

In ähnlicher Weise unterliegen die existierenden Assays dem Nachteil der "falschen Negativen", der dazu führt, daß eine Verbindung eine negative Antwort in dem Assay ergibt, obwohl die Verbindung in Wahrheit ein Ligand für das Ziel ist. Falsche Negative treten typischerweise in Assays auf, die Konzentrationen an Testverbindungen verwenden, die entweder zu hoch sind (was zu Toxizität führt) oder zu niedrig, verglichen mit der Bindungs- oder Dissoziationskonstanten zwischen Verbindung und Ziel.

Ein weiterer Hauptnachteil existierender Assays ist die eingeschränkte Menge an Information, die von dem Assay selbst

zur Verfügung gestellt wird. Obwohl der Assay in korrekter Weise Verbindungen zu identifizieren vermag, die sich an ein Zielmolekül anzubinden vermögen, oder die eine Antwort von ihm auszulösen vermögen, liefern diese Assays typischerweise keinerlei Information sowohl über spezifische Bindungsstellen auf dem Zielmolekül als auch über Struktur-Aktivitätsbeziehungen zwischen der Verbindung, die getestet wird, und dem Zielmolekül. Die Unfähigkeit, solche Information bereitzustellen, wird dann besonders problematisch, wenn der Screeningassay verwendet wird, um Substanzen zur weiteren Untersuchung zu identifizieren.

Es ist jüngst vorgeschlagen worden, daß die Röntgenkristallographie verwendet werden kann, um die Bindungsstellen von organischen Lösungsmitteln an Makromoleküle zu identifizieren. Jedoch kann dieses Verfahren keine relativen Bindungsaffinitäten an unterschiedlichen Stellen auf dem Zielmolekül bestimmen. Es ist nur für sehr stabile Zielproteine anwendbar, die in der Anwesenheit hoher Konzentrationen von organischen Lösungsmitteln nicht denaturieren. Darüber hinaus ist dieser Ansatz keine Screeningmethode für das schnelle Testen von vielen Verbindungen, die chemisch unterschiedlich sind, sondern diese Methode ist aufgrund des langen Zeitraums, der benötigt wird, um die einzelnen Kristallstrukturen zu ermitteln, eher auf das Mapping der Bindungsstellen für nur wenige organische Lösungsmittel beschränkt.

Die Verbindungen werden gescreent, um Substanzen zu identifizieren, die beim Design neuer Arzneimittelwirkstoffe verwendet werden können, um die Funktion der Zielbiomoleküle zu verändern. Diese neuen Arzneimittelwirkstoffe können strukturelle Analoga der identifizierten Substanzen sein, oder sie können Konjugate einer oder mehrerer dieser Substanzverbindungen sein. Aufgrund der Probleme, die den existierenden Screeningverfahren innewohnen, sind diese Verfahren beim Design neuer Arzneimittelwirkstoffe oft nur von geringer Hilfe.

Es besteht daher ein fortwährender Bedarf an der Bereitstellung eines neuen, schnellen, effizienten genauen und zuverlässigen Screeningverfahrens für Verbindungen, um Liganden

zu identifizieren und zu designen, die spezifisch an ein besonderes Zielmolekül binden.

#### Kurze Zusammenfassung der Erfindung

Unter einem Aspekt stellt die vorliegende Erfindung Verfahren zum Screening von Verbindungen auf ihre biologische Aktivität zur Identifizierung von Liganden bereit, die an ein spezifisches Zielmolekül binden. Dieses Verfahren umfaßt folgende Schritte: a) Erzeugung eines ersten zweidimensionalen  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  NMR Korrelationsspektrums eines  $^{15}\text{N}$ -markierten Zielmoleküls; b) Aussetzen des markierten Zielmoleküls mit einer oder mit einer Mischung von chemischen Verbindungen; c) Erzeugen eines zweiten zweidimensionalen  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  NMR Korrelationsspektrums des markierten Zielmoleküls, das mit einer oder mehreren Verbindungen in Schritt (b) ausgesetzt worden ist, und d) Vergleichen des ersten und zweiten zweidimensionalen  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  NMR Korrelationsspektrums, um die Unterschiede zwischen dem ersten und dem zweiten Spektrum zu bestimmen, wobei die Unterschiede die Anwesenheit einer oder mehrerer Verbindungen anzeigen, die Liganden sind, die an das Molekül gebunden haben.

Wo das Verfahren der vorliegenden Erfindung mehr als eine Verbindung im Schritt (b) einem Screening unterzieht, d.h. wenn eine Mischung von Verbindungen eingesetzt wird, und wo ein Unterschied zwischen dem ersten Spektrum, das vom Zielmolekül alleine aufgenommen wurde, und demjenigen, das vom Zielmolekül in Anwesenheit der Mischung aufgenommen wurde, existiert, werden zusätzliche Schritte durchgeführt, um die spezifische Verbindung oder die spezifischen Verbindungen zu identifizieren, die in der Mischung enthalten sind, und die an das Zielmolekül binden. Diese zusätzlichen Schritte umfassen die Schritte e) Aussetzen des  $^{15}\text{N}$ -markierten Zielmoleküls einzeln mit jeweils einer Verbindung der Mischung und f) Erzeugen einer zweidimensionalen  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  NMR Korrelationsspektrums des markierten Zielmoleküls, das einzeln einer jeden Verbindung ausgesetzt wurde, und g) Vergleichen eines jeden Spektrums, das in Schritt f) erzeugt wurde, mit dem ersten Spektrum, das von dem Zielmolekül alleine erzeugt wurde, um Unterschiede in irgendeinem dieser

Vergleichsspektren festzustellen, wobei die Unterschiede die Anwesenheit einer Verbindung anzeigen, die ein Ligand ist, der an das Zielmolekül gebunden hat.

Aufgrund der chemischen Verschiebungswerte der besonderen  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  Signale in dem zweidimensionalen Korrelationsspektrum, die bekannten spezifischen Loci von Atomgruppierungen im Zielmolekül entsprechen, (beispielsweise den N-H Atomen des Amids oder der Peptidbindung eines besonderen Aminosäurerestes im Polypeptid) erlaubt das Verfahren der vorliegenden Erfindung nicht nur die Identifizierung, welche Verbindung(en) an ein besonderes Zielmolekül binden, sondern es erlaubt ebenfalls die Bestimmung des besonderen Bindungsortes des Liganden auf dem Zielmolekül.

Unter einem zweiten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten  $K_D$  für einen gegebenen Liganden und sein Zielmolekül bereit. Das Verfahren umfaßt die Schritte a) Erzeugen eines ersten zweidimensionalen  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  NMR Korrelationsspektrums eines  $^{15}\text{N}$ -markierten Zielmoleküls; b) das Aussetzen des markierten Zielmoleküls mit verschiedenen Konzentrationen eines Liganden; c) das Erzeugen eines zweidimensionalen  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  NMR Korrelationsspektrums bei jeder Konzentration des Liganden in Schritt (b); d) das Vergleichen eines jeden Spektrum aus Schritt (c) mit dem ersten Spektrums aus Schritt (a); und e) das Berechnen der Dissoziationskonstanten zwischen dem Zielmolekül und dem Liganden aus eben diesen Unterschieden, in Übereinstimmung mit folgender Gleichung:

$$K_D = \frac{([P]_0 - x)([L]_0 - x)}{x}$$

Ein vorteilhafter Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Fähigkeit des Verfahrens der vorliegenden Erfindung zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten eines Liganden des Zielmoleküls in Anwesenheit eines zweiten Moleküls, das bereits an den Liganden gebunden ist. Dies ist ganz allgemein mit den Methoden gemäß dem Stand der Technik, die "naßchemische"

analytische Verfahren zur Bestimmung der Bindung eines Liganden an ein Zielmolekülsubstrat verwenden, nicht möglich.

Bei dieser bevorzugten Ausführungsform kann das Verfahren zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten eines Liganden in Anwesenheit eines zweiten gebundenen Liganden durchgeführt werden. In Übereinstimmung mit dieser Ausführungsform wird das  $^{15}\text{N}$ -markierte Zielmolekül an den zweiten Liganden gebunden, bevor dieses Ziel den Testverbindungen ausgesetzt wird.

Die Fähigkeit des vorliegenden Verfahrens zur Bestimmung nicht nur der Existenz einer Bindung zwischen einem Liganden und dem Zielmolekül, sondern auch des speziellen Bindungsortes in Anwesenheit eines zweiten gebundenen Liganden ermöglicht die Fähigkeit zum Design eines Arzneimittelwirkstoffes, der zwei oder mehrere miteinander verbundene Gruppen umfaßt, die aus den Liganden bestehen.

Dieses Verfahren verwendet zweidimensionale korrelationsspektroskopische  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  NMR Screeningverfahren, wie sie oben beschrieben worden sind, um zunächst einen ersten und dann nachfolgende Liganden zu identifizieren, die an das Zielmolekül binden. Ein Komplex des Zielmoleküls und aus zwei oder mehr Liganden wird ausgebildet, und die drei-dimensionale Struktur des Komplexes wird bestimmt, vorzugsweise unter Verwendung der NMR Spektroskopie oder Röntgenkristallographie. Diese drei-dimensionale Struktur wird verwendet, um die räumliche Orientierung der Liganden im Bezug zueinander und in Bezug auf das Zielmolekül zu bestimmen.

Beruhend auf der räumlichen Orientierung werden die Liganden miteinander verbunden, um den Wirkstoff auszubilden. Die Auswahl einer geeigneten Linkergruppe wird durchgeführt, indem die räumliche Orientierung der Liganden gegenüber einander und gegenüber dem Zielmolekül eingehalten wird, beruhend auf den Prinzipien der Bindungswinkel- und der Bindungslängeninformation, wie sie in der organischen Chemie gut bekannt sind.

Das bedeutet, daß das "Molecular Design"-Verfahren die Identifizierung einer ersten Ligandengruppierung gegenüber einem Zielmolekül unter Verwendung der zweidimensionalen  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  NMR

Korrelationsspektroskopie umfaßt, sowie die Identifizierung nachfolgender Ligandengruppierungen gegenüber dem Zielmolekül unter Verwendung zweidimensionaler  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  Korrelationsspektroskopie; und die Ausbildung eines Komplexes aus der ersten und den nachfolgenden Ligandengruppierungen gegenüber dem Zielmolekül; und die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur des Komplexes und daher der räumlichen Orientierung der ersten und der nachfolgenden Ligandengruppierungen auf dem Zielmolekül; und das Verbinden der ersten und der nachfolgenden Ligandengruppierungen unter Ausbildung des Arzneimittelwirkstoffes unter Beibehaltung der räumlichen Orientierung der Ligandengruppen.

Die Identifizierung von nachfolgenden Ligandengruppierungen kann in der Anwesenheit oder der Abwesenheit des ersten Liganden durchgeführt werden (beispielsweise kann das Zielmolekül an den ersten Liganden gebunden werden, bevor es mit den Testverbindungen zur Identifizierung des zweiten Liganden ausgesetzt wird).

Bei einer bevorzugten Ausführungsform ist das Zielmolekül, das bei dem Screening- oder Designverfahren zum Einsatz gelangt, ein Polypeptid. Das Polypeptidzielmolekül wird vorzugsweise in rekombinanter Form aus einer Wirtszelle erzeugt, die mit einem Expressionsvektor transformiert ist, der ein Polynukleotid enthält, das für das Polypeptid codiert, indem die transformierte Wirtszelle in einem Medium aufgezogen wird, das eine assimilierbare  $^{15}\text{N}$ -Quelle enthält, so daß das rekombinant erzeugte Polypeptid mit  $^{15}\text{N}$  markiert ist.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

In den Zeichnungen, die einen Teil der Beschreibung ausmachen, zeigt:

Figur 1 ein  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  Korrelationspektrum der DNA Bindungsdomäne des einheitlich  $^{15}\text{N}$ -markierten humanen Papillomavirus E2. Das Spektrum (80 komplexe Punkte, 4 Durchläufe pro freiem Induktionsabfall ["scans/fid"]) wurde an einer 0,5mM Probe von E2 in 20mM Phosphat (pH 6,5), 10mM Dithiothreitol (DTT) und 10% Deuteriumoxid ( $\text{D}_2\text{O}$ )



aufgenommen.

Figur 2 zeigt das  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  Korrelationsspektrum der DNA-Bindungsdomäne von einheitlich  $^{15}\text{N}$ -markiertem humanem Papillomavirus E2 vor (dünne mehrfache Konturen) und nach (dicke einzelne Konturen) Zugabe einer Endtestverbindung. Die Endkonzentration der Verbindung betrug 1,0mM. Alle anderen Bedingungen, sind die wie bei Figur 1 festgelegt. Ausgewählte Reste, die signifikante Veränderungen bei der Bindung aufzeigen, sind angezeigt.

Figur 3 zeigt das  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  Korrelationsspektrum der DNA-Bindungsdomäne von einheitlich  $^{15}\text{N}$  markiertem humanen Papillomavirus E2 vor (dünne mehrfache Konturen) und nach (dicke einzelne Konturen) der Zugabe einer zweiten Testverbindung. Die Endkonzentration der Verbindung war 1,0mM. Alle anderen Bedingungen sind die, wie in Figur 1 festgelegt. Ausgewählte Reste, die signifikante Veränderung bei der Bindung zeigen, sind angegeben.

Figur 4 zeigt das  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  Korrelationsspektrum des katalytischen Bereichs von einheitlich  $^{15}\text{N}$ -markiertem Stromelysin vor (dünne mehrfache Konturen) und nach (dicke einzelne Konturen) der Zugabe einer Testverbindung. Die Endkonzentration der Verbindung betrug 1,0mM. Das Spektrum (80 komplexe Punkte, 8 Durchläufe pro freiem Induktionsabfall ["scans/fid"]) wurde mit einer 0,3mM Probe von SCD in 20mM TRIS (pH 7,0); 20mM  $\text{CaCl}_2$  und 10%  $\text{D}_2\text{O}$  erhalten. Ausgewählte Reste, die signifikante Veränderungen bei der Bindung zeigen, sind angegeben.

Figur 5 zeigt das  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  Korrelationsspektrum der Ras-Bindungsdomäne des einheitlich  $^{15}\text{N}$ -markierten RAF-Peptids (Reste 55-132) vor (dünne mehrfache Konturen) und nach (dicke einfache Konturen) der Zugabe einer Testverbindung. Die Endkonzentration der Verbindung betrug 1,0mM. Das Spektrum (80 komplexe Punkte, 8 Durchläufe pro freiem Induktionsabfall ["scans/fid"]) wurde von einer 0,3mM Probe des RAF Fragmentes in 20mM Phosphat (pH 7,0), 10mM DTT und 10%  $\text{D}_2\text{O}$  erhalten. Ausgewählte Reste, die bei der Bindung signifikante Veränderungen aufzeigen, sind



angegeben.

Figur 6 zeigt die  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  Korrelationsspektren von einheitlich  $^{15}\text{N}$ -markiertem FKBP vor (dünne mehrfache Konturen) und nach (einzelne dicke Konturen) der Zugabe einer Testverbindung. Die Endkonzentration der Verbindung betrug 1,0mM. Die Spektren (80 komplexe Punkte, 4 Durchgänge pro freiem Induktionsabfall ["scans/fid"]) wurden mit einer 0,3mM Probe von FKBP in 50mM Phosphat (pH 6,5), 100mM NaCl und 10%  $\text{D}_2\text{O}$  erhalten. Ausgewählt Reste, die signifikante Veränderungen bei der Bindung anzeigen, sind angegeben.

Figur 7 zeigt eine erste Darstellung der NMR-abgeleiteten Struktur der DNA-Bindungsdomäne von E2. Die beiden Monomere des symmetrischen Dimeren sind in Kopf-Schwanz-Weise ausgerichtet und die N- und C-Termini eines jeden Monomeren sind angegeben (N und C für ein Monomer, und N\* und C\* für das andere). In den Bändern sind die Reste gezeigt, die bei der Bindung an eine erste Testverbindung signifikante Veränderungen der chemischen Verschiebung aufweisen ( $\Delta\delta(^1\text{H}) > 0.04\text{ppm}$ ;  $\Delta\delta(^{15}\text{N}) > 0.1\text{ppm}$ ). Diese Reste entsprechen der DNA-Erkennungshelix des E2. Ausgewählte Reste sind für die Erleichterung der Veranschaulichung nummeriert.

Figur 8 zeigt eine zweite Darstellung der mittels NMR abgeleiteten Struktur der DNA-Bindungsdomäne von E2. Die beiden Monomeren des symmetrischen Dimeren sind in Kopf-Schwanz-Weise orientiert, und die N- und C-Termini eines jeden Monomeren sind angezeigt (N und C für ein Monomer, N\* und C\* für das andere). In den Bändern sind die Reste gezeigt, die signifikante Veränderungen der chemischen Verschiebungen aufweisen, ( $\Delta\delta(^1\text{H}) > 0.04\text{ppm}$ ;  $\Delta\delta(^{15}\text{N}) > 0.1\text{ppm}$ ) aufgrund der Bindung an eine zweite Testverbindung. Diese Reste sind in erster Linie in der dimeren Grenzflächenregion angeordnet. Ausgewählte Reste sind zur Erleichterung der Veranschaulichung durchnummeriert.

Figur 9 zeigt eine Darstellung der mittels NMR abgeleiteten



Struktur des katalytischen Bereichs von Stromelysin. Die N- und C-Termini sind angezeigt. In den Bändern sind die Reste angezeigt, die aufgrund der Bindung an eine Testverbindung signifikante Veränderungen der chemischen Verschiebungen ( $\Delta\delta(^1\text{H}) > 0.04\text{ppm}$ ;  $\Delta\delta(^{15}\text{N}) > 0.1\text{ppm}$ ) aufweisen.

Diese bilden beide einen Teil der S1' Bindungsstelle, oder aber sie sind räumlich nahe dieser Stelle angeordnet.

Ausgewählte Reste sind zur Vereinfachung der Veranschaulichung nummeriert.

Figur 10 zeigt eine Bandaufzeichnung eines ternären Komplexes von ersten und zweiten Liganden, die an die katalytische Domäne von Stromelysin gebunden sind.

#### Eingehende Beschreibung der Erfindung

Die vorliegende Erfindung stellt ein schnelles und effizientes Screeningverfahren zur Identifikation von Liganden bereit, die an therapeutische Zielmoleküle binden.

Die Liganden werden identifiziert, indem die Bindung der Moleküle an ein Zielmolekül (beispielsweise Protein, Nukleinsäure) aufgrund der eintretenden Veränderungen der chemischen Verschiebungen des Zielmoleküls durch die Zugabe der Ligandenverbindungen aus der Datenbank mittels kernmagnetischer Resonanz- (NMR) Spektroskopie verfolgt werden.

Aus der Analyse der Veränderungen der chemischen Verschiebungen des Zielmoleküls als Funktion der Ligandkonzentration können auch die Bindungsaffinitäten des Liganden für Biomoleküle bestimmt werden.

Die Anordnung der Bindungsstelle für einen jeden Liganden wird aus einer Analyse der chemischen Verschiebungen des Biomoleküls bestimmt, die durch die Zugabe des Liganden und aufgrund des nuklearen Overhauser- Effektes (NOEs) zwischen dem Liganden und dem Biomolekül bestimmt werden.

Die Information über die Struktur/Aktivitätsbeziehungen zwischen Liganden, die mittels eines solchen Verfahrens identifizierbar sind, kann dann verwendet werden, um neue Arzneimittelwirkstoffe zu designen, die als Liganden für das Zielmolekül dienen. Beispielsweise kann, wenn zwei oder mehr

Liganden gegenüber einem gegebenen Zielmolekül identifiziert werden, ein Komplex aus diesen Liganden und dem Zielmolekül gebildet werden. Die räumliche Anordnung der Liganden einander gegenüber, wie auch in Bezug auf das Zielmolekül, wird aus der drei-dimensionalen Struktur abgeleitet. Diese räumliche Orientierung definiert den Abstand zwischen den Bindungsstellen der beiden Liganden und die Orientierung eines jeden Liganden gegenüber diesen Stellen.

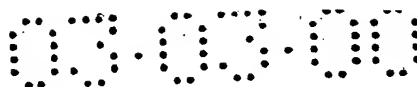
Unter Verwendung der Werte für die räumliche Orientierung werden die beiden oder mehrere Liganden dann miteinander verbunden, um einen neuen Liganden auszubilden. Die Anbindung wird auf eine Weise vollzogen, die die räumliche Orientierung der Liganden zueinander und zum Zielmolekül beibehält.

Es gibt eine Vielzahl von Vorteilen, die mit dem auf NMR-beruhenden Entdeckungsverfahren gemäß der vorliegenden Erfindung verbunden sind. Zunächst ist das Problem der "falschen Positiven" wesentlich reduziert, da ein Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung die Liganden durch direkte Messung der Bindung an das Zielmolekül identifiziert. Da das vorliegende Verfahren die spezifischen Bindungsstellen des Zielmoleküls identifiziert, ist das Problem der "falschen Positiven", die aus der nicht-spezifischen Bindung von Verbindungen bei hohen Konzentrationen an das Zielmolekül resultieren, ausgeschaltet.

Zweitens ist auch das Problem der "falschen Negativen" wesentlich reduziert, weil das vorliegende Verfahren Verbindungen zu identifizieren vermag, die bei einem breiten Spektrum von Dissoziationskonstanten spezifisch an das Zielmolekül zu binden vermögen. Die Dissoziations- oder Bindungskonstanten für die Verbindungen können dabei mit dem vorliegenden Verfahren tatsächlich bestimmt werden.

Weitere Vorteile der vorliegenden Erfindung resultieren aus der Vielzahl und der Detailliertheit der über jeden Liganden aus dem Entdeckungsverfahren bereitgestellten Daten.

Weil die Anordnung des gebundenen Liganden aus einer Analyse der chemischen Verschiebungen des Zielmoleküls, die sich aufgrund der Zugabe des Liganden ändern, und aufgrund des Kern-Overhauser-Effektes (NOEs) zwischen dem Liganden und dem



Biomolekül bestimmt werden kann, kann die Bindung eines zweiten Liganden in Anwesenheit eines ersten Liganden, der bereits an das Ziel gebunden ist, gemessen werden. Die Fähigkeit zur gleichzeitigen Identifizierung der Bindungsstellen von verschiedenen Liganden erlaubt dem Fachmann 1) negative und positive kooperative Bindungen zwischen Liganden zu definieren und 2) neue Arzneimittelwirkstoffe zu "designen", indem zwei oder mehr Liganden zu einer einzelnen Verbindung verbunden werden, während die richtige Orientierung der Liganden zueinander und zu deren Bindungsstellen beibehalten wird.

Desweiteren können, wenn mehrere Bindungsstellen existieren, die relativen Affinitäten einzelner Bindungsgruppen für die verschiedenen Bindungsstellen aus einer Analyse der Veränderungen der chemischen Verschiebungen des Zielmoleküls als Funktion der zugesetzten Ligandenkonzentration ermittelt werden. Durch das gleichzeitige Screenen vieler struktureller Analoga einer gegebenen Verbindung, kann eine detaillierte Struktur/Aktivitäts-Beziehung der Liganden bereitgestellt werden.

Unter ihrem Hauptaspekt liefert die vorliegende Erfindung ein Verfahren zu Screening von Verbindungen zur Identifikation von Liganden, die an ein spezifisches Zielmolekül binden. Dieses Verfahren umfaßt folgende Schritte: a) das Erzeugen eines ersten zweidimensionalen  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  NMR Korrelationsspektrums eines  $^{15}\text{N}$ -markierten Zielmoleküls; b) das Aussetzen des markierten Zielmoleküls mit einer oder mehreren Verbindungen; c) das Erzeugen eines zweiten zweidimensionalen  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  NMR Korrelationsspektrums des markierten Zielmoleküls, das den Verbindungen nach Schritt (b) ausgesetzt worden ist; und d) den Vergleich des ersten und des zweiten Spektrums, um zu bestimmen, ob es Unterschiede in den beiden Spektren gibt, wobei diese Unterschiede die Anwesenheit eines oder mehrerer Liganden anzeigen, die an das Zielmolekül gebunden haben.

Wenn man mit dem Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung mehr als eine Verbindung in Schritt (b) screent, und wenn ein Unterschied zwischen den Spektren beobachtet wird, werden zusätzliche Schritte durchgeführt, um zu identifizieren, welche spezielle Verbindung an die Zielmoleküle bindet. Diese



zusätzlichen Schritte umfassen die Erzeugung eines zweidimensionalen  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  NMR Korrelationsspektrums für jede einzelne Verbindung und den Vergleich jeden Spektrums mit dem ersten Spektrum, um zu bestimmen, ob die Unterschiede in irgendeinem der verglichenen Spektra existieren, wobei diese Unterschiede die Anwesenheit eines Liganden anzeigen, der an das Zielmolekül gebunden hat.

Irgendein  $^{15}\text{N}$ -markiertes Zielmolekül kann in einem Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung zum Einsatz gelangen. Aufgrund der Bedeutung der Proteine in der medizinischen Chemie ist ein Polypeptid ein bevorzugtes Zielmolekül. Das Zielmolekül kann mit  $^{15}\text{N}$  gemäß irgendeinem in der Technik bekannten Verfahren markiert werden. Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird das Zielmolekül in rekombinanter Form unter Verwendung transformierter Wirtszellen hergestellt. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Zielmolekül ein Polypeptid. Irgendein Polypeptid, das ein hoch aufgelöstes NMR-Spektrum ergibt, und das teilweise oder einheitlich mit  $^{15}\text{N}$  markiert zu werden vermag, kann verwendet werden. Die Herstellung von einheitlich  $^{15}\text{N}$ -markierten beispielhaften Polypeptidzielmolekülen ist hiernach in den Beispielen beschrieben.

Ein bevorzugtes Mittel zur Herstellung adäquater Mengen von einheitlich  $^{15}\text{N}$ -markierten Polypeptiden ist die Transformation einer Wirtszelle mit einem Expressionsvektor, der ein Polynukleotid enthält, das für das Polypeptid codiert, und die Aufzucht der transformierten Zelle in einem Kulturmedium, das assimilierbare  $^{15}\text{N}$ -Quellen enthält. Assimilierbare  $^{15}\text{N}$ -Quellen sind in der Technik gut bekannt. Eine bevorzugte Quelle ist  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ .

Die Mittel zur Herstellung des Expressionsvektors, der Polynukleotide enthält, die für spezifische Polypeptide codieren, sind in der Technik gut bekannt. In ähnlicher Weise sind ebenfalls Mittel zur Transformation von Wirtszellen mit diesen Vektoren und Mittel zur Aufzucht dieser transformierten Zellen, so daß es zur Expression des Polypeptids kommt, ebenfalls gut in der Technik bekannt.

Das Screeningverfahren der vorliegenden Erfindung beginnt

mit der Erzeugung oder Akquisition eines zweidimensionalen  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  Korrelationsspektrums des markierten Zielmoleküls. Die Mittel zur Erzeugung zweidimensionaler  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  Korrelationsspektren sind in der Technik gut bekannt (siehe beispielsweise D.A. Egan et al., Biochemistry, 32(8): 1920-1927 (1993); Bax, A., Grzesiek, S., Acc. Chem. Res., 26(4): 131-138 (1993)).

Die NMR-Spektren, die typischerweise bei dem Screeningverfahren der vorliegenden Erfindung aufgezeichnet werden, sind zweidimensionale  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  heteronukleare Einzelquantenkorrelations (HSQC) Spektren. Da die  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  Signale, die den Gerüstamiden der Proteine entsprechen, üblicherweise gut aufgelöst sind, werden die Veränderungen der chemischen Verschiebung für die einzelnen Amide einfach beobachtet.

Bei der Erzeugung solcher Spektren wird das große Wassersignal durch Spoilinggradienten unterdrückt. Um den Erhalt von NMR-Daten einer großen Anzahl von Verbindungen zu erleichtern, (beispielsweise einer Datenbank synthetischer oder natürlich vorkommender kleiner organischer Verbindungen), wird ein Probenwechsler verwendet. Unter Verwendung des Probenwechslers kann eine Menge von insgesamt 60 Proben ohne Überwachung gemessen werden. Daher können in einem Zeitraum von 24 Stunden unter Verwendung der typischen Aufzeichnungsparameter (4 Durchgängen pro freiem Induktionsabfall ("fid"), 100-120 HSQC-Spektren erhalten werden.

Um die Verarbeitung der NMR-Daten zu erleichtern, werden Computerprogramme verwendet, um die mehrfachen zweidimensionalen NMR-Datensätze zu überführen und automatisch zu verarbeiten, einschließlich einer Routine, um den zweidimensionalen NMR-Daten automatisch Phasen zuzuordnen. Die Datenanalyse kann durch die derartige Formatierung der Daten erleichtert werden, so daß die einzelnen HSQC-Spektren schnell gesichtet und mit dem HSQC-Spektrum der Kontrollprobe verglichen werden können, die nur das Trägermittel für die zugesetzte Verbindung (DMSO) enthält, jedoch keine zugesetzte Verbindung. Eingehende Beschreibungen der Maßnahmen zur Erzeugung solcher zwei-dimensionalen  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  Korrelationsspektren sind nachfolgend in den Beispielen beschrieben.



Ein beispielhaftes zweidimensionales  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  NMR Korrelationsspektrum eines  $^{15}\text{N}$ -markierten Zielmoleküls (Polypeptids) ist in Figur 1 gezeigt (die DNA-Bindungsdomäne des E2-Proteins).

Nach dem Erhalt des ersten Spektrums wird das markierte Zielmolekül einer oder mehreren Testverbindungen ausgesetzt. Wenn mehr als eine Testverbindung gleichzeitig zu testen ist, bevorzugt man, eine Verbindungsdatenbank zu verwenden, wie etwa eine Vielzahl kleiner Moleküle. Solche Moleküle werden typischerweise in perdeuteriertem Dimethylsulfoxid gelöst. Die Verbindungen in der Datenbank können vom Markt bezogen werden oder gemäß dem jeweiligen Bedarf synthetisiert werden.

Einzelne Verbindungen können unter anderem aufgrund der Größe (Molekulargewicht= 100-300) und der molekularen Diversität ausgewählt werden. Die Verbindungen in der Sammlung können unterschiedliche Formen haben (beispielsweise flache aromatische Ring(e), gefaltete aliphatische Ring(e), gerade und verzweigt-kettige Aliphaten, mit Einzel-, Doppel- oder Dreifachbindungen) und unterschiedliche funktionelle Gruppen (beispielsweise Carbonsäuren, Ester, Ether, Amine, Aldehyde, Ketone und verschiedene heterozyklische Ringe) zur Maximierung der Möglichkeiten zur Entdeckung von Verbindungen, die mit einem breiten Satz unterschiedlicher Bindungsstellen wechselwirken.

Das NMR-Screeningverfahren gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet Ligandkonzentrationen, die von etwa 0,1 bis etwa 10,0mM reichen. Bei diesen Konzentrationen können Verbindungen, die sauer oder basisch sind, den pH-Wert gepufferter Proteinlösungen wesentlich ändern. Die chemischen Verschiebungen sind gegenüber pH-Wert-Änderungen, wie auch gegenüber den direkten Bindungswechselwirkungen empfindlich, und gegenüber den "falschen Positiven" Veränderungen der chemischen Verschiebung, die nicht das Ergebnis der Ligandenbindung, jedoch das Ergebnis der pH-Wert-Änderungen sind, die daher beobachtet werden können. Es ist daher notwendig, sicherzustellen, daß sich der pH-Wert der gepufferten Lösung nicht aufgrund der Veränderung des pH-Wertes bei der Ligandenzugabe ändert. Ein Mittel zur Steuerung des pH-Wertes ist weiter unten beschrieben.

Die Verbindungen werden bei  $-10^{\circ}\text{C}$  ( $263^{\circ}\text{Kelvin}$ ) gelagert und zwar als 1,0 und 0,1M Stammlösungen in Dimethylsulfoxid (DMSO). Dies ist aufgrund der eingeschränkten Löslichkeit der Liganden in wässriger Lösung notwendig. Es ist nicht möglich, den pH-Wert der DMSO-Lösung direkt einzustellen. Zusätzlich bilden HCl und NaOH in DMSO unlösliche Salze, so daß alternative Säuren und Basen verwendet werden müssen. Der nachfolgend beschriebene Versuchsansatz hat zu einem stabilen pH-Wert geführt.

Die 1,0M Stammlösungen in DMSO werden 1:10 in 50mM Phosphat, pH 7,0 verdünnt. Die pH-Werte der verdünnten aliquoten Stammlösungsmenge wird gemessen. Wenn der pH-Wert des aliquoten Anteils unverändert ist (d.h. wenn er bei 7,0 bleibt), wird eine Arbeitslösung durch Verdünnung der DMSO-Stammlösung 1:10 unter Erhalt einer 0,1M Lösung hergestellt, und die Lösung wird gelagert.

Wenn der pH-Wert des verdünnten aliquoten Anteils weniger als 7,0 beträgt, wird Ethanolamin zu der 1,0M DMSO-Stammlösung zugesetzt, so daß die Stammlösung dann 1:10 mit Phosphatpuffer verdünnt wird, um einen weiteren Aliquot herzustellen, und der pH-Wert des Aliquoten wird erneut getestet.

Wenn der pH-Wert des verdünnten Aliquoten mehr als 7,0 beträgt, wird Essigsäure zu der 1,0M DMSO-Stammlösung zugesetzt, so daß die Stammlösung auf 1:10 mit Phosphatpuffer verdünnt wird, um einen weiteren Aliquot herzustellen, und der pH-Wert des aliquoten Anteils wird erneut getestet.

Ethanolamin und Essigsäure sind in DMSO löslich, und geeignete äquivalente Mengen werden zugesetzt, um sicherzustellen, daß bei der Überführung in wässrigen Puffer der pH-Wert unverändert bleibt. Das Einstellen des pH-Wertes ist ein Wechselwirkungsprozeß, der solange wiederholt wird, bis das gewünschte Ergebnis erhalten wird.

Man beachte, daß dieses Verfahren mit den 1:10 Verdünnungen der 1,0M Stammlösungen (100mM Ligand) durchgeführt wird, um sicherzustellen, daß keine pH-Veränderungen bei den niedrigeren Konzentrationen beobachtet werden, die in den Experimenten zum Einsatz gelangen (0,1 bis 10mM), oder in anderen/schwächeren Puffersystemen.

Nach dem Aussetzen des  $^{15}\text{N}$ -markierten Zielmoleküls mit einer oder mehreren Testverbindungen wird ein zweites zweidimensionales  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  NMR Korrelationsspektrum erzeugt. Dieses zweite Spektrum wird auf die gleiche Weise erzeugt, wie dies oben beschrieben ist. Das erste und das zweite Spektrum werden dann verglichen, um zu bestimmen, ob es irgendwelche Unterschiede zwischen den beiden Spektren gibt. Die Unterschiede in den zweidimensionalen  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  NMR Korrelationsspektren, die die Anwesenheit eines Liganden anzeigen, entsprechen den markierten  $^{15}\text{N}$ -Stellen in dem Zielmolekül. Diese Unterschiede werden unter Verwendung von Standardverfahren, die in der Technik gut bekannt sind, bestimmt.

Beispielsweise zeigen die Figuren 2, 3, 4, 5 und 6 Vergleiche der Korrelationsspektren vor und nach dem Aussetzen mit verschiedenen Zielmolekülen gegenüber verschiedenen Testverbindungen. Eine eingehende Beschreibung, wie diese Studien durchgeführt wurden, kann hiernach in den Beispielen 2 und 3 aufgefunden werden.

Besondere Signale in einem zweidimensionalen  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  NMR Korrelationsspektrum entsprechen besonderen Stickstoffatomen und Protonen im Zielmolekül (beispielsweise besonderen Amidn der Aminosäurereste im Protein). Beispielsweise kann aus Figur 2 ersehen werden, daß die chemischen Verschiebungen bei einer zweidimensionalen  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  Korrelation der DNA-Bindungsdomäne von E2 bei der Aussetzung mit einer Testverbindung an den Positionen 15 (I15), 21 (Y21), 22 (R22) und 23 (L23) der Reste eingetreten sind.

Es kann aus der Figur 2 ersehen werden, daß die Bindung des Liganden den Isoleucin- (Ile) Rest in der Position 15, den Tyrosin- (Tyr) Rest in der Position 21, den Arginin- (Arg) Rest in der Position 22 und den Leucin- (Leu) Rest in der Position 23 miteinbezog. Daher kann ein Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden, um die spezifischen Bindungsstellen zwischen einem Liganden und einem Zielmolekül zu ermitteln.

Die Region des Proteins, die für die Bindung der einzelnen Verbindungen verantwortlich ist, wird aus den besonderen Amidsignalen ermittelt, die sich durch die Zugabe der



Verbindungen ändern. Diese Signale werden den einzelnen Amidgruppen des Proteins gemäß Standardverfahren unter Verwendung einer Vielzahl von gut bestätigten heteronuklearen multi-dimensionalen NMR-Experimenten zugeordnet.

Um die Moleküle zu entdecken, die fester an das Protein binden, werden die Moleküle zum Test beruhend auf den Struktur-/Aktivitäts-Beziehungen des anfänglichen Screenings und/oder der Strukturinformation der anfänglichen Substanzen ausgewählt, wenn diese an das Protein gebunden sind. Beispielsweise kann das anfängliche Screening zu der Identifizierung von Liganden führen, die alle einen aromatischen Ring enthalten. Die zweite Screeningrunde würde dann andere aromatische Moleküle als Testverbindungen verwenden.

Wie hiernach in Beispiel 2 beschrieben, identifizierte der anfängliche Screeningassay für die Bindung an die katalytische Domäne von Stromelysin zwei Biarylverbindungen als Liganden. Die zweite Runde des Screenings verwendete daher eine Reihe von Biarylderivaten als Testverbindungen.

Der zweite Satz Testverbindungen wird anfänglich bei einer Konzentration von 1mM gescreent, und die Bindungskonstanten werden für solche Verbindungen gemessen, die eine Affinität aufzeigen. Die besten Substanzen, die an ein Protein binden, werden dann mit den Ergebnissen verglichen, die in einem funktionellen Assay erhalten werden. Diese Verbindungen, die geeignete Substanzen darstellen, werden chemisch abgewandelt, um Analoga zu erzeugen, mit dem Ziel, ein neues pharmazeutisches Mittel zu entdecken.

Unter einem anderen Aspekt liefert die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten zwischen einem Zielmolekül und einem Liganden, der an dieses Zielmolekül bindet. Dieses Verfahren umfaßt folgende Schritte: a) das Erzeugen eines ersten zweidimensionalen  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  NMR Korrelationsspektrums eines  $^{15}\text{N}$ -markierten Zielmoleküls; b) die Titration des markierten Zielmoleküls mit verschiedenen Konzentrationen eines Liganden; c) das Erzeugen eines zweidimensionalen  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  NMR Korrelationsspektrums bei jeder Ligandenkonzentration nach

Schritt (b) und d) den Vergleich eines jeden Spektrums aus Schritt (c) sowohl mit dem ersten Spektrum aus Schritt (a) und mit allen anderen Spektren aus Schritt (c), um die Differenzen zwischen diesen Spektren als Funktion der Veränderungen in der Ligandkonzentration quantitativ zu bestimmen und e) das Berechnen der Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) zwischen dem Zielmolekül und dem Liganden, beruhend auf diesen Unterschieden.

Aufgrund ihrer Bedeutung in der medizinischen Chemie ist eine bevorzugtes Zielmolekül zur Verwendung bei einem solchen Verfahren ein Polypeptid. Bei einer bevorzugten Ausführungsform kann ein Verfahren zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten eines Liganden in Anwesenheit eines zweiten Liganden durchgeführt werden. In Übereinstimmung mit dieser Ausführungsform wird das  $^{15}\text{N}$ -markierte Zielmolekül an den zweiten Liganden gebunden, bevor das Zielmolekül den Testverbindungen ausgesetzt wird.

Die Bindungs- oder Dissoziationskonstanten werden durch Verfolgung der  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  chemischen Verschiebungen des Proteins als Funktion der Ligandkonzentration bestimmt. Eine bekannte Konzentration ( $[\text{P}]_0$ ) des Zielmoleküls wird mit einer bekannten Konzentration ( $[\text{L}]_0$ ) eines zuvor identifizierten Liganden vermischt, und das zweidimensionale  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  NMR Korrelationsspektrum wird aufgezeichnet. Aus diesem Spektrum werden beobachtete chemische Verschiebungswerte ( $\delta_{\text{obs}}$ ) erhalten. Das Verfahren wird für wechselnde Konzentrationen des Liganden bis hin zum Sättigungspunkt des Zielmoleküls, wenn möglich, wiederholt, wobei in diesem Fall ein chemischer Verschiebungsgrenzwert für die Sättigung ( $\delta_{\text{sat}}$ ) gemessen wird.

In den Fällen, in denen die Sättigung des Zielmoleküls erreicht wird, wird die Dissoziationskonstante für die Bindung eines besonderen Liganden an ein Zielmolekül unter Anwendung folgender Formel berechnet:

$$K_D = \frac{([\text{P}]_0 - x)([\text{L}]_0 - x)}{x}$$

wobei  $[\text{P}]_0$  die gesamte molare Konzentration des

Zielmoleküls ist;  $[L]_0$  ist die gesamte molare Konzentration des Liganden; und  $x$  ist die molare Konzentration der gebundenen Spezies. Der Wert von  $x$  wird aus der folgenden Gleichung ermittelt:

$$x = \frac{\delta_{\text{obs}} - \delta_{\text{free}}}{\Delta}$$

worin  $\delta_{\text{free}}$  die chemische Verschiebung der freien Spezies ist; worin  $\delta_{\text{obs}}$  die beobachtete chemische Verschiebung ist; und worin  $\Delta$  der Unterschied zwischen dem chemischen Grenzverschiebungswert für die Sättigung ( $\delta_{\text{sat}}$ ) und des chemischen Verschiebungswertes des freien Zielmoleküls ohne Ligand ist ( $\delta_{\text{free}}$ ).

Die Dissoziationskonstante wird dann durch Veränderung des Wertes bestimmt, bis ein "best fit" in Bezug auf die beobachteten Werte unter Verwendung von statistischen Standard-Kurvenanpassungsmethoden erhalten wird. Für den Fall, daß  $\delta_{\text{sat}}$  nicht direkt bekannt ist, werden sowohl  $K_D$  als auch  $\delta_{\text{sat}}$  verändert und demselben Kurvenanpassungsverfahren unterworfen.

Die Anwendung des Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung zur Bestimmung der Dissoziations- oder Bindungsaffinität für verschiedene Liganden an verschiedene Zielmoleküle ist hiernach in den Beispielen 2 und 3 beschrieben.

Bevorzugte Zielmoleküle, Mittel zur Erzeugung von Spektren und Mittel zum Vergleich von Spektren sind die gleichen wie oben dargestellt.

Der anfängliche Schritt bei dem "Design"-Verfahren ist die Identifizierung zweier oder mehrerer Liganden, die an das spezifische Zielmolekül binden. Die Identifizierung solcher Liganden wird unter Verwendung der zweidimensionalen  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  NMR Korrelationsspektroskopie durchgeführt, wie dies oben beschrieben wurde.

Sobald zwei oder mehr Liganden identifiziert sind, die an das Zielmolekül an unterschiedlichen Stellen binden, wird ein

Komplex zwischen den Zielmolekülen und den Liganden ausgebildet. Wenn es zwei Liganden gibt, ist dieser Komplex ein ternärer Komplex. Quaternäre und weitere Komplexe werden ausgebildet, wenn es drei oder mehr Liganden gibt.

Die Komplexe werden ausgebildet, indem das Zielmolekül gleichzeitig oder nacheinander mit den verschiedenen Liganden unter Bedingungen vermischt wird, die diesen Liganden die Bindung an das Ziel erlauben. Mittel zur Bestimmung dieser Bedingungen sind in der Technik gut bekannt.

Sobald sich der Komplex ausgebildet hat, wird dessen dreidimensionale Struktur bestimmt. Jedwedes Mittels zur Bestimmung dreidimensionaler Strukturen kann zum Einsatz gelangen. Solche Verfahren sind in der Technik gut bekannt. Beispielhafte und bevorzugte Methode sind die NMR- und die Röntgenkristallographie. Die Verwendung dreidimensionaler Doppel- und Dreifachresonanz-NMR zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur zweier Liganden, die an die katalytische Domäne von Stromelysin gebunden sind, ist eingehend hiernach in Beispiel 4 beschrieben.

Eine Analyse der dreidimensionalen Struktur enthüllt die räumliche Anordnung der Liganden relativ zueinander, wie auch die Konformation des Zielmoleküls. Zunächst erlaubt die räumliche Orientierung eines jeden Liganden gegenüber dem Zielmolekül die Identifizierung derjenigen Teile des Liganden, die direkt an der Bindung teilhaben (beispielsweise diejenigen Teile, die mit dem Zielbindungszentrum wechselwirken), und diejenigen Teile eines jeden Liganden, die sich von den Bindungszentren weg erstrecken, wobei diese Teile bei den nachfolgenden Verknüpfungsverfahren verwendet werden können.

Zweitens werden die räumlichen Orientierungswerte verwendet, um die Positionen eines jeden Liganden relativ zueinander zu kartieren ["mapping"]. Mit anderen Worten, es werden bestimmte Abstände zwischen den räumlich ausgerichteten Liganden berechnet.

Drittens definieren die räumlichen Orientierungswerte ebenfalls die dreidimensionalen Beziehungen zwischen den Liganden und dem Ziel. Daher können zusätzlich zur Berechnung

der absoluten Distanzen zwischen den Liganden die Winkelorientierungen dieser Liganden ebenfalls bestimmt werden.

Die Kenntnis der räumlichen Orientierung der Liganden und des Ziels wird dann verwendet, um Linkergruppen auszuwählen, die zwei oder mehrere Liganden miteinander zu einer einzelnen Einheit verbinden, die alle Liganden enthält. Das Design der Linkergruppen beruht auf den Abständen und den Winkelorientierungen, die benötigt werden, um eine jede der einzelnen Ligandenteile der einzelnen Einheit in der geeigneten Ausrichtung zum Ziel zu erhalten.

Die dreidimensionale Konformation geeigneter Linker ist gut bekannt, oder für den Fachmann schnell zu ermitteln. Obwohl es theoretisch möglich ist, zwei oder mehr Liganden in jedem gewünschten Abstandsbereich und in jeder gewünschten dreidimensionalen Projektion miteinander zu verbinden, werden in der Praxis gewisse Einschränkungen des Abstandes und der Projektion bevorzugt. Bei einer bevorzugten Ausführungsform sind die Liganden durch einen Abstand von weniger als etwa 15 Angström (Å) voneinander entfernt, noch bevorzugter Weise um weniger als 10 Å und ganz besonders bevorzugt um weniger als etwa 5Å.

Sobald eine geeignete Linkergruppe aufgefunden worden ist, werden die Liganden mit dieser Linkergruppe verbunden. Mittel zur Bindung von Liganden sind in der Technik gut bekannt und hängen von der chemischen Struktur des Liganden und der Linkergruppe selbst ab. Die Liganden werden miteinander verbunden, wobei auf solche Teile des Liganden zurückgegriffen wird, die nicht direkt an der Bindung an das Zielmolekül teilhaben.

Eine eingehende Beschreibung des Designs eines Wirkstoffes, der die proteolytische Aktivität des Stromelysins hemmt, wobei dieser Wirkstoff unter Anwendung eines Verfahrens der vorliegenden Erfindung "designed" worden ist, ist hiernach in Beispiel 4 beschrieben.

Die folgenden Beispiele veranschaulichen die bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung und dienen keinesfalls der Einschränkung der Beschreibung oder der

Ansprüche.

### Beispiel 1

#### Herstellung von einheitlich $^{15}\text{N}$ -markierten Zielmolekülen

##### A. Stromelysin

Humanstromelysin ist ein 447-Aminosäurenprotein, von dem man annimmt, daß es in den proteolytischen Abbau von Knorpel miteinbezogen ist. Man nimmt an, daß die Knorpelproteolyse zu einem Abbauverlust an Gelenkknorpel führt; und die resultierende Verschlechterung der Gelenkfunktion wird sowohl bei Osteoarthritis als auch bei rheumatoider Arthritis beobachtet. Das Protein besitzt eine Reihe von Domänen, einschließlich N-terminaler latenter und Propeptid-Domänen, eine C-terminale Domäne, die zu Homopexin homolog ist, und eine innere katalytische Domäne.

Untersuchungen haben gezeigt, daß die Entfernung der N-terminalen Prosequenz von etwa achtzig Aminosäuren eintritt, wodurch das Proenzym in das reife 45kDa Enzym überführt wird. Darüber hinaus haben Untersuchungen gezeigt, daß die C-terminale Homopexin-homologe Domäne für die richtige Faltung der katalytischen Domäne oder für die Wechselwirkung mit einem Inhibitor nicht notwendig ist. (Siehe beispielsweise A.I. Marcy, Biochemistry, 30; 6476-6483 (1991)). Daher wurde das innere 81-256 Aminosäurerestsegment des Stromelysins als Proteinfragment zur Verwendung bei der Identifikation von Verbindungen verwendet, die an das Stromelysin binden, und die ein Potential zur Wirkung als Inhibitoren des Stromelysins aufweisen.

Um das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung anzuwenden, war es notwendig, das 81-256 Fragment (Sequenzidentitätsnummer (SEQ ID NO:) 1) des Stromelysins herzustellen, in dem das Peptidgerüst isotopisch mit  $^{15}\text{N}$  angereichert worden war. Dies wurde durchgeführt, indem ein Plasmid eingefügt wurde, das für die Herstellung des Proteinfragmentes in einem *E. coli* Stamm codierte und durch die Aufzucht des genetisch abgewandelten Bakterienstammes in einem einschränkenden Kulturmedium, das mit  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  und  $^{13}\text{C}$ -Glukose

angereichert war.

Das isotopisch angereicherte Proteinfragment wurde aus dem Kulturmedium isoliert, aufgereinigt und nachfolgend als Grundlage für die Beurteilung der Bindung der Testverbindungen eingesetzt. Die Verfahren für diese Prozesse sind weiter unten beschrieben.

Humane Hautfibroblasten (ATCC Nr. CRL 1507) wurden angezüchtet und gemäß dem Verfahren, das von Clark et al., Archiv. Biochem. and Biophys., 241:36-45 (1985) beschrieben wurde, induziert. Die Gesamt-RNA wurde aus 1g Zellen unter Verwendung eines Promega RNAgents® Total RNA Isolation System Kit (Katalognr. Z5110, Promega Corp., 2800 Woods Hollow Road, Madison, WI 53711-5399) gemäß den Anleitungen des Herstellers isoliert. Ein 1µg Anteil der RNA wurde bei 80°C 5 Minuten lang in der Hitze denaturiert und dann der Revers-Transcriptase PCR unter Verwendung eines GeneAmp® RNA PCR Kit (Katalognr. N808-0017, Applied Biosystems/Perkin-Elmer, 761 Main Avenue, Norwalk, CT 06859-0156) in Übereinstimmung mit den Anleitungen des Herstellers unterworfen.

Eine kombinierte PCR wurde unter Verwendung der ersten Primer (A) GAAATGAAGAGTC TTCAA

(Sequenzidentitätsnummer: 3) und (B) GCGTCCCAGGTTCTGGAG

(Sequenzidentitätsnummer: 4) und fünfunddreißig Zyklen bei 94°C (zwei Minuten; 45°C, zwei Minuten; und 72°C, drei Minuten durchgeführt. Danach wurde mit den inneren Primern (C)

ATACCATGGCCTATCCAT TGGATGGAGC

(Sequenzidentitätsnummer: 5) und (D)

ATAGGATCCTTAGGTCTCAGGGGA GTCAGG

(Sequenzidentitätsnummer: 6) erneut amplifiziert, unter Anwendung von dreißig Zyklen unter denselben Bedingungen, wie sie unmittelbar oben beschrieben sind, zur Erzeugung einer DNA, die für die Aminosäurereste 1-256 von Humanstromelysin codiert.

Das PCR-Fragment wurde im PCR-Klonierungsvektor pT7Blue(R) (Novagen, Inc., 597 Science Drive, Madison, WI 53711) gemäß den Anleitungen des Herstellers geklont. Das resultierende Plasmid

wurde mit NcoI und BamHI geschnitten, und das Stromelysinfragment wurde im Novagenexpressionsvektor pET3d (Novagen, Inc., 597 Science Drive, Madison, WI 53711) subklont, wiederum unter Befolgung der Anleitungen des Herstellers.

Ein reifes Stromelysinexpressionskonstrukt, das für die Aminosäurereste 81-256 plus initiiierendem Methionin codierte, wurde durch PCR-Amplifizierung aus dem 1-256 Expressionskonstrukt erzeugt. Das resultierende PCR-Fragment wurde zunächst im Novagen pT7Blue(R) Vektor geklont und dann im Novagen pET3d Vektor subklont, gemäß den Anleitungen des Herstellers und auf die oben beschriebene Weise, unter Erzeugung des Plasmids (pETST-83-256). Dieses Endplasmid ist mit demjenigen identisch, das von Qi-Zhuang et al., Biochemistry, 31: 11231-11235 (1992) beschrieben ist, mit der Ausnahme, daß das vorliegende Plasmid für eine Peptidsequenz codiert, die zwei Aminosäuren früher beginnt, in der Position 81 der Sequenz von Human-Stromelysin.

Das Plasmid pETST-83-256 wurde im *E. coli* Stamm BL21(DE3)/pLysS (Novagen, Inc. 597 Science Drive, Madison, WI 53711) in Übereinstimmung mit den Anleitungen des Herstellers transformiert, unter Erzeugung eines Expressionsstammes BL21(DE3)/pLysS/pETST-255-1.

Ein Vorkulturmedium wurde hergestellt, indem 1,698g an  $\text{Na}_2\text{HP}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,45g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,075g NaCl, 0,150g  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,300  $^{13}\text{C}$ -Glukose, 300µl 1M wässrig  $\text{MgSO}_4$  Lösung und 15µl wässrige  $\text{CaCl}_2$  Lösung in 150ml deionisiertem Wasser gelöst wurden.

Die resultierende Lösung des Vorkulturmediums wurde sterilisiert und in einen sterilen 500ml- Prallflächenkolben überführt. Unmittelbar vor der Animpfung des Vorkulturmediums mit dem Bakterienstamm wurden 150µl einer Lösung, die 34mg/ml Chloramphenicol in 100% Ethanol enthielt und 1,5ml einer Lösung, die 20mg/ml Ampicillin enthielt, zu den Kolbeninhalten zugesetzt.

Die Kolbeninhalte wurden dann mit 1ml einer Glyzerinstammlösung von genetisch abgewandeltem *E. coli*, Stamm BL21(DE3)/pETST-255-1 angeimpft. Der Kolbeninhalt wurde

geschüttelt (225 Umdrehungen pro Minute), bis bei 37°C bis eine optische Dichte von 0,65 beobachtet werden konnte.

Ein Gärnährmedium wurde hergestellt, indem 113,28g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 30g von  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5g  $\text{NaCl}$  und 10ml 1% DF-60 Antischäumungsmittel in 9604ml deionisiertem Wasser gelöst wurden. Diese Lösung wurde in einem New Brunswick Scientific Micros Fermenter (Edison, NJ) eingefüllt und bei 121°C 40 Minuten lang sterilisiert.

Unmittelbar vor der Animpfung des Fermentationsmediums wurden die folgenden vor-sterilisierten Bestandteile zu dem Fermentationsgefäßinhalt zugesetzt: 100ml einer 10%igen wässrigen Lösung von  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ , 100ml einer 10%igen wässrigen Lösung an  $^{13}\text{C}$ -Glukose, 20ml einer wässrigen 1M Lösung an  $\text{MgSO}_4$ , 1ml einer wässrigen 1M  $\text{CaCl}_2$  Lösung, 5ml einer wässrigen Lösung von Thiaminhydrochlorid (10mg/ml), 10ml einer Lösung, die 34mg/ml Chloramphenicol in 100% Ethanol enthielt und 1,9g Ampicillin, gelöst in der Chloramphenicollösung. Der pH-Wert der resultierenden Lösung wurde durch die Zugabe einer wässrigen Lösung von 4N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  auf 7,00 eingestellt.

Die Vorkultur des *E. coli*, Stamm BL21(DE3)/pLysS/pETST-255-1 aus dem Schüttelkolbenverfahren, das oben beschrieben worden ist, wurde zu dem Gärbottichinhalt zugesetzt, und das Zellwachstum wurde solange voranschreiten lassen, bis eine optische Dichte von 0,48 erreicht wurde. Während dieses Vorganges wurde der Gärbottichinhalt automatisch durch die Zugabe von 4N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  oder 4N KOH wie gewünscht auf einem pH-Wert von 7,0 gehalten. Der gelöste Sauerstoffgehalt des Gärbottichinhaltes wurde über 55% Luftsättigung gehalten, indem eine Kaskadenschleife mit erhöhter Rührgeschwindigkeit zum Einsatz kam, wenn der gelöste Sauerstoffgehalt unerhalb 55% fiel. Es wurde Luft zu dem Gärbottichinhalt mit 7 Standardlitern pro Minute (SLPM) eingeschleußt, und die Aufzuchttemperatur wurde während des gesamten Verfahrens bei 37°C belassen.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 17.000g 10 Minuten lang bei 4°C geerntet, und die resultierenden Zellpellets wurden gesammelt und bei -85°C gelagert. Die Naßzellausbeute betrug 3,5g/l. Die Analyse der löslichen und

unlöslichen Fraktionen der Zellysate mittels Natriumdodecylsulfatpolyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) zeigte auf, daß etwa 50% des  $^{15}\text{N}$ -Stromelysins in der löslichen Phase aufzufinden war.

Das isotopisch markierte Stromelysinfragment, das wie oben beschrieben hergestellt worden war, wurde aufgereinigt unter Anwendung einer Abwandlung des Verfahrens, das von Ye et al., Biochemistry, 31:11231-11235 (1992) beschrieben ist.

Die geernteten Zellen wurden in 20mM Tris HCl-Puffer (pH-Wert 8.0) suspendiert, mit einer Natriumazidlösung, die 1mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,5mM  $\text{ZnCl}_2$ , 25 Einheiten/ml an Benzonase® Enzym enthielt, und in einer Inhibitions Mischung, die aus 4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid ("AEBSF"), Leupeptin®, Aprotinin®, und Pepstatin® (alle mit Konzentrationen von 1µg/ml bestand. AEBSF, Leupeptin®, Aprotinin® und Pepstatin® sind von American International Chemical, 17 Strathmore Road, Natick, MA 01760) erhältlich.

Die erhaltene Mischung wurde eine Stunde lang leicht gerührt und dann auf 4°C abgekühlt. Die Zellen wurden dann mit Ultraschall zerkleinert, unter Verwendung eines 50%igen Einsatzzzyklus. Das resultierende Lysat wurde dann bei 14.000 Umdrehungen pro Minute 30 Minuten lang zentrifugiert, und das Pellet der unlöslichen Fraktion wurde bei -80°C für die nachfolgende Behandlung (siehe unten) eingefroren.

Es wurde festes Ammoniumsulfat zum Überstand bis zum Punkt 20%iger Sättigung zugeführt, und die resultierende Lösung wurde auf eine 700ml Phenylsepharose Schnellflußsäule ("Q-Sepharose FF") (Pharmacia Biotech., 800 Centennial Ave., P. O. Box 1327, Piscataway, NJ 08855) gegeben. Vor der Aufgabe wurde die Sepharosesäule mit 50mM Tris-HCl Puffer (pH 7.6 bei 4°C), 5mM  $\text{CaCl}_2$  und 1M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ins Gleichgewicht gesetzt. Die beladene Säule wurde mit einem linearen Gradienten abnehmender Konzentrationen von wässriger  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (von 1 bis hinunter zu 0M) und mit aufsteigenden Konzentrationen von wässrigem  $\text{CaCl}_2$  (von 5 bis 20mM) in Tris-HCl Puffer bei pH 7,6 eluiert.

Die aktiven Fraktionen des Eluats wurden gesammelt und in einer Amicon-Rührzelle aufkonzentriert (Amicon, Inc., 72 Cherry

Hill Drive, Beverly, MA 01915). Die aufkonzentrierte Probe wurde über Nacht in dem Ausgangspuffer dialysiert, der mit der Q-Sepharose FF Säule verwendet worden war, 50mM Tris-HCl (pH 8,2 bei 4°C) mit 10mM CaCl<sub>2</sub>.

Die dialysierte Probe wurde dann auf die Q-Sepharose FF Säule gegeben und mit einem linearen Gradienten eluiert, der den Ausgangspuffer und 200mM NaCl umfaßte. Die gereinigte lösliche Fraktion des isotopisch markierten Stromelysinfragments wurde aufkonzentriert und bei 4°C aufbewahrt.

Das Pellet wurde in 8M Guanidin-HCl aufgelöst. Die Lösung wurde 20 Minuten lang bei 20.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, und der Überstand wurde tropfenweise zu einem Faltungspuffer zugesetzt, der 50mM Tris-HCl (pH 7,6), 10mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5mM ZnCl<sub>2</sub> und den Inhibitorcocktail von AEBSF, Leupeptin®, Aprotinin® und Pepstatin® (alle mit Konzentrationen von 1µg/ml) umfaßte. Das Volumen des Faltungspuffers betrug zehnmal dasjenige des Überstandes. Die Mischung aus Überstand und Faltungspuffer wurde 30 Minuten lang bei 20.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert.

Der Überstand aus dieser Zentrifugation wurde bei 4°C aufbewahrt, und das Pellet wurde zwei Schritten, wie sie oben beschrieben sind, d.h. der Auflösung in Guanidin-HCl, der erneuten Faltung im Puffer und der Zentrifugation unterworfen. Die Endüberstände einer jeden der drei Zentrifugationen wurden vereinigt, und es wurde festes Ammoniumsulfat bis zum Punkt 20%iger Sättigung zugesetzt. Die so erhaltene resultierende Lösung der unlöslichen Fraktion wurde einer Aufreinigung an Phenylsepharose und an Q-Sepharose wie oben für die lösliche Fraktion beschrieben, unterworfen.

Die gereinigten löslichen und unlöslichen Fraktionen wurden vereinigt, unter Erzeugung von 1,8mg aufgereinigtem isotopisch markierten Stromelysin 81-256 Fragments pro Gramm der ursprünglichen Zellpaste.

#### B. Humanpapillomavirus (HPV) E2 Inhibitoren

Die Papillomaviren sind eine Familie kleiner DNA-Viren, die Genitalwarzen und Gehirntumore hervorrufen. Das E2-Protein von

HPV reguliert die virale Transkription und ist für die virale Replikation notwendig. Daher können Moleküle, die die Bindung von E2 an DNA blockieren, nützliche therapeutische Mittel gegen HPV darstellen. Es wurde das Protein anstelle der DNA als Zielmolekül ausgewählt, da erwartet werden kann, daß man Mittel größerer Selektivität auffinden könnte, die eher an das Protein als an die DNA binden.

Die DNA-Bindungsdomäne des Humanpapillomavirus E2 wurde aus der DNA von voller Länge geklont, die für E2 codiert, unter Verwendung von PCR-Verfahren; und sie wurde in Bakterien unter Verwendung des T7 Expressionssystems exprimiert. Einheitlich  $^{15}\text{N}$ -markiertes Protein wurde aus Bakterien isoliert, die auf einem Minimalmedium angezüchtet worden waren, das  $^{15}\text{N}$ -markiertes Ammoniumchlorid enthielt. Das Protein wurde aus dem bakteriellen Zellysat unter Verwendung einer S-Sepharose FastFlow Säule isoliert, die mit Puffer (50mM Tris, 100mM NaCl, 1mM EDTA, pH = 8,3) voräquiliibriert worden war.

Das Protein wurde mit einem linearen Gradienten von 100-500mM NaCl in Puffer eluiert, vereinigt und auf eine Mono-S Säule bei pH 7,0 aufgegeben. Das Protein wurde mit einem Salzgradienten (100-500mM) eluiert, auf 0,3mM aufkonzentriert und in eine TRIS (50mM, pH 7,0, gepufferte  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9/1) Lösung ausgetauscht, die Natriumazid (0,5%) enthielt.

#### C. RAF

Einheitlich  $^{15}\text{N}$ -markierte Ras-Bindungsdomäne des RAF-Proteins wurde hergestellt, wie dies in Emerson et al., Biochemistry, 34 (21):6911-6918 (1995) beschrieben ist.

#### D. FKBP

Einheitlich  $^{15}\text{N}$ -markiertes rekombinantes Human- FK-Bindungsprotein (FKBP) wurde hergestellt, wie dies in Logan et al., J. Mol. Biol., 236: 637-648 (1994) beschrieben ist.

### Beispiel 2

Screening von Verbindungen unter Verwendung zweidimensionaler  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  NMR Korrelationsspektalanalyse

Der katalytische Bereich des Stromelysins wurde in Übereinstimmung mit den Verfahren nach Beispiel 1 hergestellt. Die Proteinlösungen, die bei dem Screeningassay zum Einsatz gelangten, enthielten die einheitlich  $^{15}\text{N}$ -markierte katalytische Domäne des Stromelysins (0,3mM), Acetohydroxamsäure (500mM),  $\text{CaCl}_2$  (20mM) und Natriumazid (0,5%) in einer  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9/1) TRIS gepufferten Lösung (50mM, pH=7,0).

Zweidimensionale  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  NMR-Spektren wurden bei 29°C mit einem Bruker AMX500 NMR Spektrometer aufgenommen, das mit einer Dreifach- Resonanzsonde ausgestattet war und mit einem Bruker Probenwechsler. Die  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  HSQC Spektren wurden als 80 x 1024 komplexe Punkte aufgezeichnet, unter Verwendung von Sweepbreiten von 2000Hz ( $^{15}\text{N}$ ,  $t^1$ ) und 8333Hz ( $^1\text{H}$ ,  $t^2$ ). Eine Verzögerungszeit von 1 Sekunde zwischen den Scans und 8 Scans pro freiem Induktionsabfall [free induction decay(fid)] wurde bei der Datenaufzeichnung angewendet. Alle NMR-Spektren wurden verarbeitet und mit einem Silicon Graphics Computer unter Verwendung von im Hause angefertigter Software analysiert.

Ein erstes zweidimensionales  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  NMR Korrelationsspektrum wurde für das  $^{15}\text{N}$ -markierte Stromelysin Zielmolekül wie oben beschrieben aufgezeichnet. Das Stromelysin Target wurde dann einer Datenbank von Testverbindungen ausgesetzt. Stammlösungen der Verbindungen wurden bei 100mM und 1M Konzentration hergestellt. Zusätzlich wurde eine Kombinationsbibliothek hergestellt, die 8-10 Verbindungen pro Probe mit einer Konzentration von 100mM pro Verbindung enthielt.

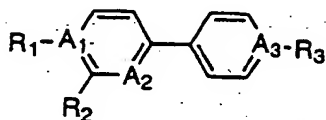
Der pH-Wert der 1M Stammlösung wurde mit Essigsäure und Ethanolamin so eingestellt, daß kein pH-Wechsel bei einer 1/10 Verdünnung mit einer 100mM phosphatgepufferten Lösung (pH=7,0) beobachtet werden konnte. Es ist wichtig, den pH-Wert einzustellen, da bereits geringe Änderungen des pH's die chemischen Verschiebungen der Biomoleküle verändern können, und daher die Interpretation der NMR-Daten verkomplizieren können.

Die Verbindungen in der Datenbank wurden aufgrund von Größe (Molekulargewicht = 100-300) und molekularer Verschiedenheit ausgewählt. Die Moleküle in der Sammlung hatten unterschiedliche Formen (beispielsweise flache aromatische Ringe, gefaltete

aliphatische Ringe, geradkettige und verzweigtkettige Aliphaten mit Einzel-, Doppel- oder Dreifachbindungen und unterschiedliche funktionelle Gruppen (beispielsweise Carbonsäuren, Ester, Ether, Amine, Aldehyde, Ketone und verschiedene heterocyclische Ringe), um die Möglichkeit zu maximieren, daß eine Verbindung aufgefunden würde, die mit den im breiten Maße unterschiedlichen Bindungszentren interagieren könnte.

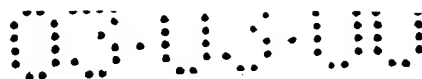
Die NMR-Proben wurden hergestellt, indem 4µl der DMSO Stammlösung zu den Verbindungsmischungen hinzugegeben wurde, die jede Verbindung mit einer Konzentration von 100mM in 0,4ml H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9/1) gepufferter Lösung des einheitlich <sup>15</sup>N-markierten Proteins enthielt. Die Endkonzentration einer jeden der Verbindungen in der NMR-Probe betrug etwa 1mM.

Bei dem anfänglichen Screening wurden zwei Verbindungen aufgefunden, die an die katalytische Domäne des Stromelysins banden. Beide dieser Verbindungen enthielten eine Biarylgruppe. Beruhend auf diesen Anfangstreffern wurden strukturmäßig ähnliche Verbindungen gegenüber Stromelysin getestet. Die Struktur dieser Biarylverbindungen ist durch die Struktur I unten gezeigt. (siehe Tabelle 1 für die Definitionen von R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> und A<sub>1</sub>-A<sub>3</sub>).



In der zweiten Screeningrunde wurde die Bindung sowohl in der Abwesenheit als auch in der Anwesenheit von sättigenden Mengen an Acetohydroxamsäure (500mM) untersucht.

Von vielen der Biarylverbindungen wurde herausgefunden, daß sie an die katalytische Domäne des Stromelysins binden. Fig. 4 zeigt ein repräsentatives zweidimensionales <sup>15</sup>N/<sup>1</sup>H NMR Korrelationsspektrum vor und nach dem Aussetzen des Stromelysins gegenüber einer Biaryltestverbindung. Es kann aus Fig. 4 ersehen werden, daß die Verbindung chemische Verschiebungen der <sup>15</sup>N-Zentren wie jener, die mit W124, T187, A199 und G204 bezeichnet worden sind, hervorrief.



Diese Zentren entsprechen einem Tryptophan (Trp) Rest in der Position 124, einem Threonin (Thr) Rest, in der Position 187, einem Alanin (Ala) Rest in der Position 199 und einem Glycin (Gly) Rest in der Position 204 von Sequenzidentitätsnummer 1. Fig. 9 zeigt die Korrelation zwischen den NMR-Bindungsdaten und einer Übersicht der NMR-abgeleiteten dreidimensionalen Struktur der katalytischen Domäne von Stromelysin. Die Fähigkeit zur räumlichen Bestimmung des spezifischen Bindungszentrums eines besonderen Liganden ist ein Vorteil der vorliegenden Erfindung.

Einige Verbindungen banden an das Stromelysin nur in der Anwesenheit von Hydroxamsäure. Daher wurde die Bindungsaffinität einiger Verbindungen in der Anwesenheit von Hydroxamsäure (d.h. kooperativ) gesteigert. Diese Ergebnisse sind beispielhaft für eine weitere wichtige Eigenschaft des hier vorgestellten Screeningassays: nämlich die Möglichkeit zur Identifikation von Verbindungen, die an das Protein in Anwesenheit anderer Moleküle binden.

Verschiedene Biarylverbindungen der Struktur I wurden im Hinblick auf ihre Bindung an Stromelysin bei unterschiedlichen Konzentrationen getestet. Die  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ - Spektren, die bei jeder Konzentration erzeugt wurden, wurden beurteilt, um Unterschiede in den Spektren als Funktion der Verbindungskonzentration zu quantifizieren. Eine Bindungs- oder Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) wurde berechnet, unter Anwendung von Standardverfahren, die in der Technik gut bekannt sind, und unter Zugrundelegung dieser Unterschiede. Die Ergebnisse dieser Studie sind in der Tabelle 1 gezeigt. Die Werte für  $R_1$ - $R_3$  und  $A_1$ - $A_3$  in Tabelle 1 beziehen sich auf die entsprechenden Positionen in der Struktur I oben.

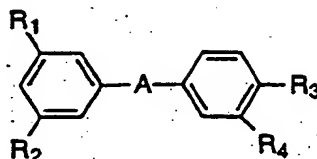
Tabelle 1

Verbindungs- nummer	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	K <sub>D</sub> (mM)
1	H	OH	H	C	C	C	1.1
2	CH <sub>2</sub> OH	H	H	C	C	C	3.2
3	Br	H	OH	C	C	C	1.3
4	H	H	H	N	N	C	1.6
5	CHO	H	H	C	C	C	1.7
6	OCH <sub>3</sub>	NH <sub>2</sub>	H	C	C	C	0.4
7	H	H	H	N	C	C	0.2
8	OCOCH <sub>3</sub>	H	H	C	C	C	0.3
9	OH	H	OH	C	C	C	0.16
10	H	H	H	N	C	N	0.4
11	OH	H	H	C	C	C	0.3
12	OH	H	CN	C	C	C	0.02

Die Werte in der Tabelle 1 zeigen die Nützlichkeit eines Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung bei der Bestimmung der Dissoziations- oder Bindungskonstanten zwischen einem Liganden und einem Zielmolekül.

Ein weiterer Vorteil des NMR-Screeningassays der vorliegenden Erfindung ist die Fähigkeit zur Korrelation beobachteter chemischer Verschiebungen aus den zweidimensionalen <sup>15</sup>N/<sup>1</sup>H NMR Korrelationsspektren mit anderen Spektren oder Projektionen der Zielmolekülkonfiguration. Die Ergebnisse eines repräsentativen Beispiels einer solchen Korrelation sind in der Fig. 9 gezeigt, die die Regionen innerhalb des Polypeptids zeigt, bei denen die Bindung des Substratmoleküls am wahrscheinlichsten eintritt. In dieser Figur sind die offensichtlichen Bindungsregionen im Stromelysin für die Verbindung 1 (aus Tabelle 1) gezeigt.

Verbindungen aus der Datenbank wurden auf ähnliche Weise in Bezug auf ihre Bindung an die DNA-Bindungsdomäne des E2-Proteins gescreent. Diese Verbindungen hatten die Struktur II unten, worin  $R_1$ - $R_4$  und A gemäß Tabelle 2 definiert sind.



Die NMR-Experimente wurden bei 29°C mit einem Bruker AMX500 NMR Spektrometer durchgeführt, das mit einer Dreifach-Resonanzsonde und einem Bruker Probenwechsler ausgestattet war. Die  $^{15}\text{N}$ -/ $^1\text{H}$  HSQC Spektren wurden als 80 x 1024 komplexe Punkte aufgezeichnet, unter Verwendung von Sweep-Breiten von 2000 Hz ( $^{15}\text{N}$ ,  $t_1$ ) und 8333Hz ( $^1\text{H}$ ,  $t_2$ ). Eine Verzögerung von 1 Sekunde zwischen den Scans und 4 Scans pro freiem Induktionsabfall wurden zur Datenaufzeichnung angewendet. Alle NMR-Spektren wurden auf einem Silicon Graphics Computer verarbeitet und analysiert.

Die Figuren 2 und 3 zeigen repräsentative zweidimensionale  $^{15}\text{N}$ / $^1\text{H}$  NMR Korrelationsspektren vor und nach dem Aussetzen der DNA-Bindungsdomäne mit jeweils einer ersten und einer zweiten Testverbindung.

Es kann aus der Figur 2 ersehen werden, daß die erste Testverbindung die chemische Verschiebung der  $^{15}\text{N}$ -Zentren erzeugte, und zwar derjenigen, die mit I15, Y21, R22 und L23 bezeichnet sind. Diese Zentren entsprechen einem Isoleucin (Ile) Rest in der Position 15, einem Tyrosinrest (Tyr) in der Position 21, einem Arginin (Arg) Rest in der Position 22 und einem Leucin (Leu) Rest in der Position 23 der Sequenzidentitätsnummer 6.

Es kann aus der Figur 3 gesehen werden, daß die zweite Testverbindung chemische Verschiebungen hervorrief, insbesondere an den  $^{15}\text{N}$ -Zentren, die mit I16, G11, H38 und T52 bezeichnet sind. Diese Zentren entsprechen einem Isoleucin (Ile) Rest in der Position 6, einem Glycin (Gly) Rest in der Position 11,

einem Histidin (His) Rest in der Position 38 und einem Threonin (Thr) Rest in der Position 52 der Sequenzidentitätsnummer 6.

Die Figuren 7 und 8 zeigen die Korrelation zwischen den NMR-Bindungsdaten und einer Ansicht der NMR-abgeleiteten dreidimensionalen Struktur der DNA-Bindungsdomäne von E2.

Viele strukturell ähnliche Verbindungen riefen chemische Verschiebungsveränderungen der Proteinsignale hervor, wenn sie bei einer Konzentration von 1mM gescreent wurden. Zwei unterschiedliche Sätze von Amidresonanzen wurden bei der Zugabe der Verbindungen als einer Veränderung unterliegend identifiziert, nämlich: ein Satz von Signalen, die den Amidn entsprachen, die sich in dem  $\beta$ -Faß befanden, das zwischen den beiden Monomeren ausgebildet war, und ein zweiter Satz, der den Amidn entsprach, die sich in der Nähe der DNA-Bindungsstelle befanden.

Beispielsweise riefen Verbindungen, die zwei Phenylringe enthielten, die mit einer Carbonsäure an die Kohlenstoffbindung der beiden Ringe angebunden war, nur chemische Verschiebungsveränderungen der Amide am DNA-Bindungszentrum hervor. Im Gegensatz dazu banden Benzophenone und Phenoxyphenyl-enthaltende Verbindungen nur an das  $\beta$ -Faß. Andere Verbindungen erzeugten Veränderungen der chemischen Verschiebungen beider Signalsätze, sie verschoben die Signale in jedem Satz jedoch um unterschiedliche Ausmaße, was für die Anwesenheit zweier unterschiedlicher Bindungszentren spricht.

Durch die Beobachtungen der Veränderungen der chemischen Verschiebung als Funktion der Ligandenkonzentration konnten die Bindungskonstanten für die beiden Bindungszentren ebenfalls gemessen werden. Die Ergebnisse dieser Studien sind in der Tabelle 2 unten zusammengefaßt.

**Tabelle 2**

Verbindungs-nr.	A	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	DNA K <sub>D</sub> (mM)	β-Faß K <sub>D</sub> (mM)	Filter- bindungs- assay
13	CO	H	H	H	OH	>50	0.6	-
14	O	H	H	H	CH <sub>2</sub> OH	>50	2.0	-
15	<sup>a</sup>	H	H	COO	H	2.0	>50	+
16	<sup>a</sup>	Cl	Cl	COO	H	0.1	>50	+
17	<sup>a</sup>	H	H	CH <sub>2</sub> COO	H	4.2	4.9	+
18	<sup>a</sup>	H	H	CH=CHCOO	H	1.2	6.2	+
19	O	H	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) -CH <sub>2</sub> COO	H	0.5	0.2	+
20	O	H	H	COCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COO	H	2.7	4.8	+

<sup>a</sup> Ein Balken (-) für A zeigt kein Atom an (d.h. Biphenylverbindung)

Die einheitlich <sup>15</sup>N-markierte Ras-Bindungsdomäne des RAF-Proteins wurde hergestellt, wie dies in Beispiel 1 beschrieben ist, und unter Anwendung zweidimensionaler <sup>15</sup>N/<sup>1</sup>H NMR Korrelationsspektralanalyse in Übereinstimmung mit den oben beschriebenen NMR-Verfahren gescreent. Die Ergebnisse einer repräsentativen Studie sind in der Figur 5 gezeigt, die zweidimensionale <sup>15</sup>N/<sup>1</sup>H NMR-Korrelationsspektren sowohl vor als auch nach der Aussetzung mit einer Testverbindung zeigt.

Einheitlich <sup>15</sup>N-markiertes FKBP wurde hergestellt, wie dies in Beispiel 1 beschrieben ist, und unter Verwendung zweidimensionaler <sup>15</sup>N/<sup>1</sup>H NMR Korrelationsspektralanalyse in Übereinstimmung mit den NMR-Verfahren gescreent, die oben beschrieben sind. Die Ergebnisse einer repräsentativen Studie sind in der Figur 6 gezeigt, die zweidimensionale <sup>15</sup>N/<sup>1</sup>H NMR Korrelationsspektren sowohl vor als auch nach der Aussetzung mit einer Testverbindung zeigt.

### Beispiel 3

Vergleich von NMR-, enzymatischen, Filterbindungs- und Gelverschiebungsscreeningassays

Die Studien wurden durchgeführt, um die Bindungskonstanten der Liganden an verschiedene Biomoleküle, wie sie mittels dem NMR-Verfahren der vorliegenden Erfindung erhalten worden waren, mit ähnlichen Ergebnissen zu vergleichen, die aus den Methoden gemäß dem Stand der Technik hervorgegangen waren.

In einer ersten Untersuchung wurden die Bindungskonstanten bestimmt, sowohl nach dem NMR-Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung, als auch gemäß einem enzymatischen Assay wie er aus dem Stand der Technik bekannt ist. Das Zielmolekül war die katalytische Domäne des Stromelysins, hergestellt in Übereinstimmung mit den Verfahren nach Beispiel 1. Die NMR Bindungskonstanten  $K_D$  wurden unter Verwendung zweidimensionaler  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  NMR Korrelationspektroskopie abgeleitet, wie dies in Beispiel 2 beschrieben ist. Die so erhaltenen  $K_D$ -Werte wurden mit einer Inhibitionskonstante  $K_I$  verglichen, wie sie in einem enzymatischen Assay ermittelt worden war.

Der enzymatische Assay maß die Geschwindigkeit der Spaltung eines fluorogenen Substrates durch den nachfolgenden Fluoreszenzanstieg aufgrund der Peptidspaltung, die eine Auftrennung zwischen dem Fluorophor und der löslichen Substanz bewirkt. Die enzymatische Aktivität wurden unter Verwendung einer Matrix unterschiedlicher Konzentrationen von Acetohydroxamsäure und Biarylverbindungen gemessen. Der Assay ist eine Abwandlung des Verfahrens, das von H. Weingarten, et al. in Anal. Biochem., 147:437-440 (1985) beschrieben ist, und das die fluorogenen Substrateigenschaften verwendet, die von E. Matayoshi, et al. in Science: 247: 954-958 (1990) beschrieben wurden.

Acht Acetohydroxamsäurekonzentrationen wurden verwendet, die von 0,0 bis 1,0M reichten, und sechs Verbindungskonzentrationen wurden verwendet, was zu einer Gesamtmenge von 48 Meßpunkten führte. Die einzelnen Konzentrationen der Verbindungen wurden aufgrund der Löslichkeit und Wirksamkeit verändert.

Alle NMR-Messungen wurden in Anwesenheit von 500mM Acetohydroxamsäure durchgeführt, außer der Titration der Acetohydroxamsäure selbst. Die Dissoziationskonstanten wurden

aus der Abhängigkeit der beobachteten Veränderungen der chemischen Verschiebung bei Zugabe des Liganden erhalten. Die Inhibitionskonstanten wurden dann aus den Inhibitionsdaten unter Verwendung von Standardverfahren erhalten.

Die Ergebnisse dieser Studien sind in der Tabelle 3 unten zusammengefaßt, die den Vergleich der mittels NMR abgeleiteten Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) mit Inhibitionskonstanten erlaubt, die bei dem Enzymassay ( $K_I$ ) unter Verwendung eines fluorogenen Substrates gemessen wurden.

**Tabelle 3**

<u>Verbindungsnr.</u>	<u>NMR <math>K_D</math> (mM)</u>	<u>Assay <math>K_I</math> (mM)</u>
4	1.6	7.4
7	0.17	0.32
9	0.16	0.70
10	0.40	1.8
12	0.02	0.11
Acetohydroxamsäure	17.0	21.1

Die Werte in Tabelle 3 zeigen, daß ein NMR-Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung einen schnellen, effizienten und genauen Weg zur Bestimmung der Dissoziations- oder Bindungskonstanten vom Liganden an Zielbiomoleküle bereitstellt. Der Vergleich der Bindungskonstanten, die gemäß den beiden Verfahren ermittelt worden sind, führt zur gleichen Bewertung der Wirksamkeiten der getesteten Verbindungen. D.h., obwohl die Werte für ein gegebenes Substrat, wie sie jeweils mit einem der beiden Verfahren ermittelt wurden, nicht gleich sind, sind sie dennoch zueinander proportional.

Im Rahmen einer zweiten Studie wurden die Resultate der Bindung der DNA-Bindungsdomäne von E2 an seine Ziel-DNA gemäß Verfahren nach dem Stand der Technik ermittelt, und mit den Ergebnissen verglichen, die gemäß dem Verfahren der vorliegenden Erfindung erhalten worden waren. Das Ziel war die DNA-Bindungsdomäne von E2, hergestellt in Übereinstimmung mit dem Verfahren nach Beispiel 1. Die NMR-Screeningassays und die NMR-Verfahren zur Bestimmung der Ligandendissoziationskonstanten

wurden durchgeführt, wie dies oben in Beispiel 2 beschrieben ist.

Die Bindungskonstante des NMR-Verfahrens wurde mit den Ergebnissen eines physikalischen Filterbindungsassays verglichen, der die DNA maß, die an das Ziel gebunden hatte. Der Hochdurchsatz-Filterbindungsassay wurde unter Verwendung von E2 durchgeführt, das, wie dies in Beispiel 2 oben beschrieben ist, hergestellt worden war. Das <sup>33</sup>P-markierte DNA-Konstrukt umfaßte ein 10.329 Basenpaarplasmid, das durch den Einschub des HPV-11 Genoms, das drei Bindungsstellen mit hoher Affinität und eine E2-Bindungsstelle mit niedriger Affinität enthielt, in das PSP-65 Plasmid (Promega, Madison, WI) ausgebildet worden war.

Die Bindungsaffinitäten an den unterschiedlichen Zentren, wie sie mittels der NMR ermittelt worden waren, wurden für eine Untergruppe der Erfindungen mit der Inhibition der E2-Bindung an die DNA verglichen, wie sie im Rahmen des Filterbindungsassays gemessen worden war. Wie in der Tabelle 2 oben gezeigt, korrelierten die bei dem Filterbindungsassay ermittelten Aktivitäten streng mit den Bindungsaffinitäten, die aus den Amidn der DNA-Bindungscentren ermittelt worden waren, jedoch nicht mit den Affinitäten, die für die  $\beta$ -Faß-Stelle gemessen worden waren. Dieses stimmt mit der relativen Anordnung eines jeden der Bindungscentren überein.

Bei einer alternativen Studie wurde ein Vergleich der auf NMR beruhenden Bindungsergebnisse mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt, die mittels eines Gelverschiebungsassays nach dem Stand der Technik erhalten worden waren, unter Verwendung vom im Stand der Technik gut bekannten Verfahrenweisen. Der Gelverschiebungsassay wurde unter Verwendung eines GST-Fusionsproteins, das E2 von voller Länge und ein <sup>33</sup>P-markiertes 62 Basenpaar DNA-Fragment mit zwei E2 Bindungsstellen enthielt, durchgeführt.

Das Verfahren identifizierte viele Verbindungen, die in dem Gel-Verschiebungsassay positive Ergebnisse ergaben. Einige dieser positiven Ergebnisse beruhen jedoch, wie man annimmt, auf der Bindung an DNA, da in diesen Fällen keine Bindung an das E2 Protein während des NMR-Verfahrens gemäß der vorliegenden

Erfindung beobachtet werden konnte. Es konnte gezeigt werden, daß diese Verbindungen eher an DNA als an E2 binden, wie dies durch die Veränderungen bei den chemischen Verschiebungen der DNA anstelle des Proteins bei der Zugabe der Verbindungen bewiesen wird. Diese Werte zeigen noch einen weiteren Vorteil der vorliegenden Erfindung, nämlich deren Fähigkeit zur Minimierung des Auftretens falscher positiver Ergebnisse.

#### Beispiel 4

(fällt nicht unter den Schutzzumfang der vorliegenden Erfindung)

#### Das Design eines wirksamen nicht-Peptidinhibitors von Stromelysin

Es wurden Studien durchgeführt, um neue Liganden zu "designen", die an die katalytische Domäne von Stromelysin binden. Da Stromelysin eine Autolyse eingeht, wurde ein Inhibitor erdacht, um den Abbau von Stromelysin zu unterbinden. Dieser Inhibitor würde das Screening anderer möglicher Liganden erleichtern, die an andere Zentren des Enzyms binden.

Die Kriterien, die zur Auswahl der Verbindungen beim Screening für andere Bindungszentren zugrundegelegt wurden, beruhten in erster Linie auf der Ligandengröße. Vom kleinsten Ligand wurde angenommen, daß er genügend Löslichkeit aufwies, um das Enzym zu sättigen (>98%ige Belegung des Enzyms) und zu inhibieren.

Die Klonierung, Expression und Aufreinigung der katalytischen Domäne des Stromelysin wurde gemäß den Verfahren durchgeführt, wie sie in Beispiel 1 dargestellt sind. Ein anfänglicher Schritt beim Design des neuen Liganden war die Identifizierung eines ersten Liganden, der an das Stromelysinziel band. Eine solche Identifikation wurde in Übereinstimmung mit einem zweidimensionalen  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  NMR Korrelationsscreeningverfahren, wie es oben offenbart ist, durchgeführt.

Eine Vielzahl von Hydroxamsäuren der allgemeinen Formel  $\text{R}-(\text{CO})\text{NHOH}$  wurden in Bezug auf die Bindung an Stromelysin unter Verwendung der Verfahren, wie sie in Beispiel 2 dargelegt sind, durchgeführt. Von den getesteten Verbindungen erfüllte

Acetohydroxamsäure [ $\text{CH}_3(\text{CO})\text{NHOH}$ ] die Selektionskriterien am besten: sie hatte eine Bindungsaffinität für Stromelysin von 17mM und eine gute Wasserlöslichkeit. Bei einer Konzentration von 500mM inhibierte Acetohydroxamsäure den Abbau des Enzyms, wodurch das Screening weiterer möglicher Liganden ermöglicht wurde.

Der zweite Schritt bei dem Designverfahren war die Identifizierung eines zweiten Liganden, der an das Zielstromelysin, in Bezug auf das Bindungszentrum für Acetohydroxamsäure, an ein unterschiedliches Zentrum band. Dies wurde sichergestellt, indem Verbindungen in Bezug auf ihre Fähigkeit zur Bindung an Stromelysin in Anwesenheit von sättigenden Mengen an Acetohydroxamsäure gescreent wurden. Die Einzelheiten der Verfahren und die Ergebnisse dieses zweiten Identifizierungsschrittes sind in Beispiel 2 oben dargelegt.

Die Verbindung, die als zweiter Ligand im Rahmen dieser Studien ermittelt worden war, und die für die nachfolgenden Designschritte verwendet wurde, war die Verbindung, die als Verbindung Nr. 4 in der Tabelle 1 (siehe Beispiel 2) gekennzeichnet ist.

Der nächste Schritt bei dem Designverfahren war die Konstruktion eines ternären Komplexes des Zielstromelysins, des ersten Liganden und des zweiten Liganden. Dies wurde durch das Aussetzen des Stromelysinzielmoleküls mit zwei Liganden unter Bedingungen durchgeführt, die zu einer Komplexbildung führten. Die dreidimensionale Struktur des ternären Komplexes wurde dann unter Verwendung von NMR-Spektroskopie ermittelt, wie dies unten beschrieben ist.

Die  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  Gerüstresonanzen von Stromelysin im ternären Komplex wurden gemäß der Analyse verschiedener 3D Dreifach- und Doppelresonanz NMR-Spektren zugeordnet (A.Bax. et al., Acc. Chem. Res., 26:131-138 (1993)). Die  $\text{C}^\alpha$ -Resonanzen der benachbarten Spinsysteme wurden aus einer Analyse der dreidimensionalen (3D) HNCA- (L. Kay et al., J. Magn. Reson., 89:496-514 (1990)) und HN(CO)CA (A. Bax, et al., J. Bio. NMR, 1:99 (1991)) Spektren identifiziert, die bei identischen Spektralbreiten von 1773Hz (35.0ppm), 3788Hz (30.1ppm) und 8333Hz

(16.67ppm) jeweils in der  $F_1(^{15}\text{N})$ ,  $F_2(^{13}\text{C})$  und  $F_3(^1\text{H})$  Dimension aufgezeichnet worden war.

Die Datenmatrix enthielt  $38(t_1) \times 48(t_2) \times 1024(t_3)$  komplexe Punkte für das HNCA-Spektrum und  $32(t_1) \times 40(t_2) \times 1024(t_3)$  komplexe Punkte für das HN(CO)CA Spektrum. Beide Spektren wurden mit 16 Scans pro Inkrement aufgezeichnet. Ein 3D CBCA(CO)NH Spektrum (S. Grzesiek, et al., J. Am. Chem. Soc., **114**:6261-6293 (1992)) wurde mit  $32(t_1, ^{15}\text{N}) \times 48(t_2, ^{13}\text{C}) \times 1024(t_3, ^1\text{H})$  komplexen Punkten und 32 Scans pro Inkrement aufgezeichnet. Die Spektralbreiten betrugen 1773Hz (35.0ppm), 7575.8Hz (60.2ppm) und 8333Hz (16.67ppm) jeweils in der  $^{15}\text{N}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und  $^1\text{H}$ -Dimension.

Für alle drei Spektren wurde die  $^1\text{H}$ -Trägerfrequenz auf die Wasserresonanz gesetzt, und die  $^{15}\text{N}$ -Trägerfrequenz betrug 119.1ppm. Die  $^{13}\text{C}$ -Trägerfrequenz wurde in den HNCA und HC(CO)CA Experimenten auf 55.0ppm gesetzt und auf 46.0ppm beim CBCA(CO)NH Experiment.

Die Gerüstzuordnungen wurden aus der Analyse der Kreuzpeaks bestätigt, die in einem  $^{15}\text{N}$ -abseparierten 3D NOESY-HSQC-Spektrum und in einem 3D HNHA-J-Spektrum sichtbar sind. Die  $^{15}\text{N}$ -abseparierten NOESY-HSQC-Spektren (S. Fesik, et al., J. Magn. Reson., **87**:588-593 (1988)); D. Marion, et al., J. Am. Chem. Soc., **111**:1515-1517 (1989)) wurden mit einer Mischungszeit von 80ms. aufgezeichnet. Insgesamt  $68(t_1, ^{15}\text{N}) \times 96(t_2, ^1\text{H}) \times 1024(t_3, ^1\text{H})$  komplexe Punkte mit 16 Scans pro Inkrement wurden aufgezeichnet, und die Spektralbreiten betrugen 1773Hz (35.0ppm) für die  $^{15}\text{N}$ -Dimension, 6666.6Hz ( $t_2, ^1\text{H}$ , 13.3ppm) und 8333Hz (16.7ppm) für die  $^1\text{H}$ -Dimension.

Das 3D HNHA-J Spektrum (G. Vuister, et al., J. Am. Chem. Soc., **115**:7772-7777 (1993)), das ebenfalls verwendet worden war, um die  $^3\text{JHNH}\alpha$  Kupplungskonstanten zu ermitteln, wurde mit  $35(t_1, ^{15}\text{N}) \times 64(t_2, ^1\text{H}) \times 1024(t_3, ^1\text{H})$  komplexen Punkten und 32 Scans pro Inkrement aufgezeichnet. Die Spektralbreiten und die Trägerfrequenzen waren mit denjenigen des  $^{15}\text{N}$ -abseparierten NOESY-HSQC-Spektrums identisch. Viele der  $\text{H}^\beta$ -Signale wurden unter Verwendung des HNHB-Experimentes zugeordnet. Die Sweep-Breiten waren die gleiche wie beim  $^{15}\text{N}$ -abseparierten NOESY-HSQC-Spektrum

das mit  $32(t_1, ^{15}\text{N}) \times 96(t_2, ^1\text{H}) \times 1024(t_3, ^1\text{H})$  komplexen Punkten aufgezeichnet wurde.

Die  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  chemischen Verschiebungen wurden für fast alle Seitenkettenresonanzen zugeordnet. Ein 3D HCCH-TOCSY-Spektrum (L. Kay, et al., J. Magn. Reson., **101b**:333-337 (1993)) wurde mit einer Mischungszeit von 13ms. unter Verwendung der DIPSI-2-Sequenz (S. Rucker, et al., Mol. Phys., **68**:509 (1989)) zur  $^{13}\text{C}$  isotropen Mischung aufgezeichnet. Insgesamt  $96(t_1, ^{13}\text{C}) \times 96(t_2, ^1\text{H}) \times 1024(t_3, ^1\text{H})$  komplexe Datenpunkte wurden mit 16 Scans pro Inkrement aufgezeichnet, unter Verwendung einer Spektralbreite von 10638Hz (70.8ppm,  $w_1$ ), 4000Hz (6.67ppm,  $w_2$ ) und 4844 (8.07ppm,  $w_3$ ). Die Trägerpositionen betrugen jeweils 40ppm, 2.5ppm und bei der Wasserfrequenz für das  $^{13}\text{C}$ , bzw. die indirekten detektierten  $^1\text{H}$  und beobachteten  $^1\text{H}$ -Dimensionen.

Eine weitere 3D HCCH-TOCSY Studie wurde mit dem  $^{13}\text{C}$ -Träger bei 122.5ppm durchgeführt, um die aromatischen Reste zuzuordnen. Die Spektren wurden mit  $36(t_1, ^{13}\text{C}) \times 48(t_2, ^1\text{H}) \times 1024(t_3, ^1\text{H})$  komplexen Punkten mit Spektralbreiten von 5263Hz (35.0ppm,  $w_1$ ), 3180Hz (5.30ppm,  $w_2$ ) und 10.000 (16.7ppm,  $w_3$ ) aufgezeichnet. Die Trägerpositionen betrugen 122.5ppm, 7.5ppm und bei der Wasserfrequenz für  $^{13}\text{C}$  wurde jeweils  $^1\text{H}$  indirekt detektiert bzw. die  $^1\text{H}$ -Dimensionen beobachtet.

Ein  $^{13}\text{C}$ - absepariertes 3D NOESY-HMQC-Spektrum (S. Fesik, et al., J. Magn. Reson., **87**:588-593 (1988)); D. Marion, et al., J. Am. Chem. Soc., **111**:1515-1517 (1989)) wurde unter Verwendung einer Mischungszeit von 75ms aufgezeichnet. Insgesamt  $80(t_1, ^{13}\text{C}) \times 72(t_2, ^1\text{H}) \times 1024(t_3, ^1\text{H})$  komplexe Datenpunkte mit 16 Scans pro Inkrement wurden mit Spektralbreiten von 10638Hz (70.49ppm,  $w_1$ ), 6666.6Hz (13.3ppm,  $w_2$ ) und 8333.3Hz (16.67ppm,  $w_3$ ) aufgezeichnet. Die  $^1\text{H}$ -Trägerfrequenzen wurden auf die Wasserresonanz gesetzt, und die  $^{13}\text{C}$ -Trägerfrequenz wurde auf 40.0ppm gesetzt.

Die stereospezifischen Zuordnungen der Methylgruppen der Valin- und Leucinreste wurden unter Verwendung eines biosynthetischen Ansatzes durchgeführt (Neri et al., Biochem., **28**:7510-7516 (1989)) auf der Basis des  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  Ein-Bindungskopplungsmusters, das im hochauflösenden  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrum (G. Bodenhausen, et al., J. Chem. Phys. Lett., **69**:185-

189 (1980)) einer fraktionär  $^{13}\text{C}$ -markierten Proteinprobe sichtbar ist. Das Spektrum wurde mit  $200(^{13}\text{C}, t_1) \times 2048(^1\text{H}, t_2)$  komplexen Punkten über Spektralbreiten von 5000Hz (39.8ppm,  $^{13}\text{C}$ ) und 8333Hz (16.7ppm,  $^1\text{H}$ ) aufgezeichnet. Die Trägerpositionen betrugen 20.0ppm für die  $^{13}\text{C}$ -Dimension, und bei der Wasserfrequenz für die  $^1\text{H}$ -Dimension.

Um die NOEs zwischen den beiden Liganden und dem Protein zu detektieren, wurde ein 3D  $^{12}\text{C}$ -gefiltertes,  $^{13}\text{C}$ -bezogenes NOESY-Spektrum aufgezeichnet. Das Pulsschema bestand aus einer doppelten  $^{13}\text{C}$ -Filtersequenz (A. Gemmeker, et al., J. Magn. Reson., 96:199-204 (1992)), gefolgt von einer NOESY-HMOC-Sequenz (S. Fesik, et al., J. Magn. Reson., 87:588-593 (1988)); D. Marion, et al., J. Am. Chem. Soc., 111:1515-1517 (1989)). Das Spektrum wurde mit einer Mischungszeit von 80ms aufgezeichnet und mit insgesamt 80 ( $t_1, ^{13}\text{C}$ )  $\times$  80 ( $t_2, ^1\text{H}$ )  $\times$  1024 ( $t_3, ^1\text{H}$ ) komplexen Punkten bei 16 Scans pro Inkrement. Die Spektralbreiten betrugen 8865Hz (17.73ppm,  $w_1$ ) 6667Hz (13.33ppm,  $w_2$ ) und 8333Hz (16.67ppm,  $w_3$ ) und die Trägerpositionen betrugen 40.0ppm für die Kohlenstoffdimension und bei der Wasserfrequenz für beide Protonendimensionen.

Um die Amidgruppen zu identifizieren, die langsam mit dem Lösungsmittel austauschten, wurde eine Reihe von  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren (G. Bodenhausen, et al., J. Chem. Phys. Lett., 69:185-189 (1980)) bei 25°C in 2-stündigen Intervallen aufgezeichnet, nachdem das Protein mit  $\text{D}_2\text{O}$  ausgetauscht worden war. Die Aufzeichnung des ersten HSQC-Spektrums wurde 2 Stunden nach der Zugabe von  $\text{D}_2\text{O}$  gestartet.

Alle NMR-Spektren wurden bei 25°C mit einem Bruker AMX500 oder AMX600 NMR-Spektrometer aufgezeichnet. Die NMR-Daten wurden mit einem Silicon Graphics Computer verarbeitet und analysiert. Bei allen NMR-Experimenten wurden gepulste Feldgradienten, wo geeignet, angelegt, wie dies beschrieben ist von A. Bax, et al., (J. Magn. Reson., 99:638 (1992)), um die Unterdrückung des Lösungsmittelsignals und die Unterdrückung von spektralen Artefakten zu bewerkstelligen. Die Quadraturdetektion bei den indirekt detektierten Dimensionen wurde unter Verwendung des States-TPPI-Verfahrens (D. Marion, et al., J. Am. Chem. Soc.,

111:1515-1517 (1989)) durchgeführt. Die lineare Vorhersage wurde verwendet, wie dies von (E. Olejniczak, et al., J. Mag. Reson., 87:628-632 (1990)) beschrieben worden ist.

Die abgeleitete dreidimensionale Struktur des ternären Komplexes wurde dann verwendet, um die räumliche Anordnung der ersten und zweiten Liganden zueinander zu definieren, wie auch die des Zielstromelysinmoleküls.

Die Distanzeinschränkungen, die aus den NOE-Daten abgeleitet worden waren, wurden in sechs Kategorien beruhend auf der NOE Kreuzpeakintensität eingereiht, und ihnen wurde jeweils eine untere Grenze von 1.8Å und obere Grenzen von 2.5Å, 3.0Å, 3.5Å, 4.0Å, 4.5Å und 5.0Å erteilt. Die Einschränkungen für die  $\phi$  Drehwinkel wurden aus den  $^3\text{JHNH}\alpha$  Kopplungskonstanten abgeleitet, die im 3D HNHA-J-Spektrum gemessen worden waren (G. Vuister, et al., J. Am. Chem. Soc., 115:7772-7777 (1993)). Der  $\phi$ -Winkel war auf  $120\% \pm 40\%$  für  $^3\text{JHNH}\alpha > 8.5\text{Hz}$  und auf  $60\% \pm 40\%$  für  $^3\text{JHNH}\alpha < 5\text{Hz}$  eingeschränkt.

Die Wasserstoffbindungen, die für die langsam austauschenden Amide beruhend auf den anfänglichen Strukturen bestimmt worden waren, waren durch zwei Einschränkungen definiert: 1.8-2.5Å für den H-O-Abstand und 1.8-3.3Å für den N-O-Abstand. Die Strukturen wurden mit dem X-PLOR 3.1 Programm (A. Brünger, "XPLOR 3.1 Manual," Yale University Press, New Haven, 1992) auf dem Silicon Graphics Computer unter Verwendung eines Hybriddistanzgeometrie-simulierten Verschmelzungsansatzes (M. Nilges, et al., FEBS Lett., 229:317-324 (1988)) berechnet.

Eine Gesamtmenge von 1032 genäherten Interprotonen-Distanzeinschränkungen wurden aus den NOE-Daten abgeleitet. Zusätzlich wurden 21 eindeutige intermolekulare Abstandseinschränkungen aus einem 3D  $^{12}\text{C}$ -gefilterten,  $^{13}\text{C}$ -bezogenen NOESY-Spektrum ermittelt. Von den 1032 NOE-Einschränkungen, die das Protein betrafen, waren 341 im inneren des Restes, 410 waren sequenzielle oder Kurzdistanzeinschränkungen zwischen den Resten, die in den primären Sequenzen durch weniger als fünf Aminosäuren voneinander getrennt waren, und 281 waren weitreichende

Einschränkungen, die Reste umfaßten, die mindestens durch fünf Reste voneinander getrennt waren.

Zusätzlich zu den NOE-Distanzeinschränkungen wurden 14  $\phi$  dihedrale Winkелеinschränkungen in die Strukturberechnungen mit einbezogen, die aus den drei Bindungskopplungskonstanten ( $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ ) abgeleitet worden waren, die aus einem HNHA-J-Spektrum (G. Viioster, et al., J. Am. Chem. Soc., **115**:7771-7777 (1993)) bestimmt worden waren. Die experimentellen Einschränkungen umfaßten ebenfalls 120 Distanzeinschränkungen, die 60 Wasserstoffbindungen entsprachen. Die Amide, die an den Wasserstoffbindungen teilnahmen, wurden aufgrund ihrer charakteristischen langsamen Austauschrate identifiziert, und die Wasserstoffbindungspartner der anfänglichen NMR-Strukturen wurden ohne die Wasserstoffbindungseinschränkungen berechnet. Die Gesamtanzahl nicht-redundanter experimentell abgeleiteter Einschränkungen war 1166.

Die Strukturen waren in ausgezeichneter Übereinstimmung mit den experimentellen NMR-Einschränkungen. Es gab keine Distanzabweichungen, die größer waren als 0.4Å und keine dihedralen Winkelabweichungen, die größer waren als 5 Grad. Zusätzlich war die simulierte Energie für den van der Waals Abstoßungsterm klein, was anzeigt, daß es in diesen Strukturen keine schlechten interatomaren Kontakte gibt.

Die NMR-Strukturen wiesen ebenfalls eine gute kovalente Bindungsgeometrie auf, wie durch die geringen Bindungslängen und Bindungswinkelabweichungen von den entsprechenden idealisierten Parametern angezeigt. Die mittlere kleinste quadratische Standardabweichung der Atomabstände in den 8 Strukturen für die Reste 93-247 aus den mittleren Koordinaten betrug 0.93Å für die Gerüstatome ( $\text{C}^\alpha$ , N, und  $\text{C}'$ ) und 1.43Å für alle Nicht-Wasserstoffatome.

Eine Banddarstellung des ternären Komplexes, der Stromelysin miteinbezieht, sowie Acetohydroxamsäure (den ersten Liganden) und den zweiten Liganden ist in der Figur 10 gezeigt. Die Struktur ähnelt sehr der Gesamtfaltung der anderen Matrix Metalloproteinasen und besteht aus einem fünfsträngigen  $\beta$ -Bogen

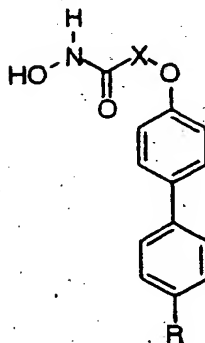
und drei  $\alpha$ -Helices.

Das katalytische Zink befand sich in der Bindungstasche. Es wurde von drei Histidinen und den beiden Sauerstoffatomen der Acetohydroxamsäure koordiniert. Eine Biarylgruppe des zweiten Liganden befand sich in der S1' Tasche zwischen der zweiten Helix und der Schleife, die aus den Resten 218-223 gebildet wurde. Diese tiefe und enge Tasche ist mit hydrophoben Resten beschichtet, die günstige Kontakte zum Liganden erzeugen.

Beruhend auf der dreidimensionalen Struktur des ternären Komplexes, wie er oben bestimmt wurde, und den Struktur/Aktivitäts-Beziehungen, die für die Bindung des Stromelysins an Strukturanaloga des zweiten Liganden (beispielsweise andere Biarylverbindungen) beobachtet worden sind, wurden neue Moleküle "designed", die die Acetohydroxamsäure mit den Biarylen verband.

Wie in der Tabelle 4 unten gezeigt, enthielten die anfänglich gewählten Biaryle einen Sauerstofflinker und die Abwesenheit oder Anwesenheit von CN in Parastellung zur Biarylbindung. Die anfänglichen Linker enthielten variierende Längen an Methylenheiten. Mittel zum Verbinden der Verbindungen mit den Linkern, die schwankende Methylenheitenlängen aufweisen, sind in der Technik gut bekannt.

Tabelle 4



Verbindung	X	R	Stromelysin-inhibition
21	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	H	0.31 µM
22	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	H	110 µM
23	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	H	38% @ 100 µM
24	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	H	43% @ 100 µM
25	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	CN	0.025 µM
26	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	CN	3.4 µM
27	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	CN	3.5 µM
28	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	CN	1.7 µM

Wie aufgrund der besseren Bindung der CN-substituierten Biaryle an Stromelysin zu erwarten, wiesen die CN-Derivate eine bessere Stromelysininhibition auf. Die Verbindung, die die beste Inhibition des Stromelysins aufwies, enthielt einen Linker mit zwei Methylenheiten.

Die vorliegende Erfindung ist unter Bezugnahme auf bevorzugte Ausführungsformen beschrieben worden. Diese Ausführungsformen schränken die Ansprüche und die Beschreibung in keineswegs ein.

# SEQUENZAUFLISTUNG

## (1) Allgemeine Information

(i) Anmelder: Fesik, Stephen W.

Hajduk, Philip J.

(ii) Titel der Erfindung: Verwendung von Magnetischer Kernresonanz zur Identifikation von Liganden an Biomolekülen

(iii) Anzahl von Sequenzen: 6

(iv) Korrespondenzadresse:

(A) Adressat: Steven F. Weinstock, Dept. 377 AP6D  
Abbott Laboratories

(B) Straße: 100 Abbott Park Road

(C) Stadt: Abbott Park

(D) Staat: Illinois

(E) Land: USA

(F) Postleitzahl: 60064-3500

(v) Computerlesbare Form:

(A) Mediumtyp: Floppy disk

(B) Computer: IBM PC kompatibel

(C) Betriebssystem: PC-DOS/MS-DOS

(D) Programm: PatentIn Release #1.0, Version #1.30

(vi) Daten der vorliegenden Anmeldung:

(A) Anmeldenummer:

(B) Anmeldetag:

(C) Klassifizierung:

(viii) Angaben zum Anwalt/Vertreter:

(A) Name: Janssen, Jerry F.

(B) Registrierungsnummer: 29,175

(ix) Telekommunikationsinformation:

(A) Telefon: 708-937-4558

(B) Telefax: 708-938-7742      ##

(2) Information für Sequenzidentitätsnummer 1:

(i) Sequenzeigenschaften:

- (A) Länge: 174 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (C) Strängigkeit: einzeln
- (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Peptid

(xi) Sequenzbeschreibung: Sequenzidentitätsnummer 1:

Phe	Arg	Thr	Phe	Pro	Gly	Ile	Pro	Lys	Trp	Arg	Lys	Thr	His	Leu	Thr
1				5					10					15	
Tyr	Arg	Ile	Val	Asn	Tyr	Thr	Pro	Asp	Leu	Pro	Lys	Asp	Ala	Val	Asp
			20					25					30		
Ser	Ala	Val	Glu	Lys	Ala	Leu	Lys	Val	Trp	Glu	Glu	Val	Thr	Pro	Leu
		35					40					45			
Thr	Phe	Ser	Arg	Leu	Tyr	Glu	Gly	Glu	Ala	Asp	Ile	Met	Ile	Ser	Phe
	50					55					60				
Ala	Val	Arg	Glu	His	Gly	Asp	Phe	Tyr	Pro	Phe	Asp	Gly	Pro	Gly	Asn
65					70					75					80
Val	Leu	Ala	His	Ala	Tyr	Ala	Pro	Gly	Pro	Gly	Ile	Asn	Gly	Asp	Ala
				85					90					95	
His	Phe	Asp	Asp	Asp	Glu	Gln	Trp	Thr	Lys	Asp	Thr	Thr	Gly	Thr	Asn
			100					105					110		
Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Ala	His	Glu	Ile	Gly	His	Ser	Leu	Gly	Leu	Phe
		115					120					125			
His	Ser	Ala	Asn	Thr	Glu	Ala	Leu	Met	Tyr	Pro	Leu	Tyr	His	Ser	Leu
		130				135					140				
Thr	Asp	Leu	Thr	Arg	Phe	Arg	Leu	Ser	Gln	Asp	Asp	Ile	Asn	Gly	Ile
145					150					155					160
Gln	Ser	Leu	Tyr	Gly	Pro	Pro	Pro	Asp	Ser	Pro	Glu	Thr	Pro		
				165					170						

(2) Information für Sequenzidentitätsnummer 2:

(i) Sequenzeigenschaften:

- (A) Länge: 83 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (C) Strängigkeit: einzeln
- (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Peptid

(xi) Sequenzbeschreibung: Sequenzidentitätsnummer 2:

```

Met Ala Thr Thr Pro Ile Ile His Leu Lys Gly Asp Ala Asn Ile Leu
1      5      10      15
Leu Cys Leu Arg Tyr Arg Leu Ser Lys Tyr Lys Gln Leu Tyr Glu Gln
20      25      30
Ser Val Ser Thr Trp His Trp Thr Cys Thr Asp Gly Lys His Lys Asn
35      40      45
Ala Ile Val Thr Leu Thr Tyr Ile Ser Thr Ser Gln Arg Asp Asp Phe
50      55      60
Leu Asn Thr Val Lys Ile Pro Asn Thr Val Ser Val Ser Thr Gly Tyr
65      70      75      80
Met Thr Ile

```

(2) Information für Sequenzidentitätsnummer 3:

(i) Sequenzeigenschaften:

- (A) Länge: 18 Aminosäuren
- (B) Typ: Nukleinsäure
- (C) Strängigkeit: einzeln
- (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNA (genomisch)

(xi) Sequenzbeschreibung: Sequenzidentitätsnummer 3:

GAAATGAAGA GTCTTCAA  
18

(2) Information für Sequenzidentitätsnummer 4:

(i) Sequenzeigenschaften:

- (A) Länge: 18 Basenpaare
- (B) Typ: Nukleinsäure
- (C) Strängigkeit: einzeln
- (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNA (genomisch)

(xi) Sequenzbeschreibung: Sequenzidentitätsnummer 4:

CGGTCCCAGG TTCTGGAG  
18

(2) Information für Sequenzidentitätsnummer 5:

(i) Sequenzeigenschaften:

- (A) Länge: 28 Basenpaare
- (B) Typ: Nukleinsäure
- (C) Strängigkeit: einzeln
- (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNA (genomisch)

(xi) Sequenzbeschreibung: Sequenzidentitätsnummer 5:

ATACCATGGC CTATCCATTG GATGGAGC  
28

(2) Information für Sequenzidentitätsnummer 6:

(i) Sequenzeigenschaften:

- (A) Länge: 30 Basenpaare
- (B) Typ: Nukleinsäure



## PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zum Screening von Verbindungen zur Identifikation von Verbindungen, die an spezifische Zielmoleküle bindende Liganden sind, wobei das Verfahren folgende Schritte umfaßt:

- a) Erzeugen eines ersten zweidimensionalen  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  NMR Korrelationsspektrums eines  $^{15}\text{N}$ -markierten Zielmoleküls;
- b) Aussetzen des markierten Zielmoleküls mit einer chemischen Verbindung oder einer Mischung von chemischen Verbindungen;
- c) Erzeugen eines zweiten zweidimensionalen  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  NMR Korrelationsspektrums des markierten Zielmoleküls, das in Schritt b) einer oder einer Mischung von Verbindungen ausgesetzt worden ist; und
- d) Vergleich der ersten und zweiten zweidimensionalen  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  NMR Korrelationsspektren, um Unterschiede zwischen den ersten und zweiten Spektren zu ermitteln, wobei diese Unterschiede die Anwesenheit einer oder mehrerer Verbindungen anzeigen, die Liganden sind, die an das Zielmolekül gebunden haben.

2. Verfahren nach Anspruch 1, worin das  $^{15}\text{N}$ -markierte Zielmolekül in Schritt (b) einer Mischung von chemischen Verbindungen ausgesetzt wird, wobei das Verfahren noch folgende, nach Schritt d) erfolgende Schritte umfaßt:

- e) einzelnes Aussetzen des  $^{15}\text{N}$ -markierten Zielmoleküls mit jeder Verbindung der Mischung,
- f) Erzeugen eines zweidimensionalen  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  NMR Korrelationsspektrums des markierten Zielmoleküls, das jeder Verbindung einzeln ausgesetzt worden ist; und
- g) Vergleich eines jeden in Schritt f) erzeugten Spektrums mit dem ersten Spektrum, um Unterschiede in irgendeinem der verglichenen Spektren zu ermitteln, wobei die Unterschiede die Anwesenheit einer Verbindung identifizieren, die ein Ligand ist, der an das

Zielmolekül gebunden hat.

3. Verfahren nach Anspruch 1, worin die Unterschiede in den zweidimensionalen  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  NMR Korrelationsspektren chemische Verschiebungen an besonderen,  $^{15}\text{N}$ -markierten Stellen des Zielmoleküls und chemische Verschiebungen von Protonen sind, die an diese  $^{15}\text{N}$ -markierten Stellen gebunden sind.

4. Verfahren nach Anspruch 1, worin das Zielmolekül ein Polypeptid ist.

5. Verfahren zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten zwischen einem Zielmolekül und einem Liganden, der an das Zielmolekül bindet, wobei das Verfahren folgende Schritte umfaßt:

- a) Erzeugen eines ersten zweidimensionalen  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  NMR Korrelationsspektrums eines  $^{15}\text{N}$ -markierten Zielmoleküls;
- b) Aussetzen des markierten Zielmoleküls mit verschiedenen Konzentrationen eines Liganden;
- c) Erzeugen eines zweidimensionalen  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  NMR Korrelationsspektrums bei jeder Ligandenkonzentration nach Schritt b); und
- d) Vergleich jeden Spektrums aus Schritt c) sowohl mit dem ersten Spektrum aus Schritt a) als auch mit allen anderen Spektren aus Schritt c), um die Unterschiede in diesen Spektren quantitativ als Funktion der sich verändernden Ligandenkonzentration zu bestimmen; und
- e) Berechnen der Dissoziationskonstanten zwischen dem Zielmolekül und dem Liganden, auf der Grundlage dieser Unterschiede und gemäß der folgenden Gleichung:

$$K_D = \frac{([P]_0 - x)([L]_0 - x)}{x}$$

worin  $[P]_0$  die gesamte molare Konzentration des Zielmoleküls ist;

$[L]_0$  die gesamte molare Konzentration des Liganden ist; und  
 $x$  die molare Konzentration der gebundenen Spezies ist, wie

sie gemäß der folgenden Gleichung ermittelt wurde:

$$x = \frac{\delta_{\text{obs}} - \delta_{\text{free}}}{\Delta}$$

worin  $\delta_{\text{obs}}$  und  $\delta_{\text{free}}$  chemischen Verschiebungswerte für das Zielmolekül sind, die jeweils bei jeder Ligandenkonzentration und für das Zielmolekül in Ligandenabwesenheit ermittelt wurden, und worin  $\Delta$  der Unterschied in der chemischen Verschiebung zwischen der Ligandensättigungsmenge und  $\delta_{\text{free}}$  ist.

6. Verfahren nach Anspruch 5, worin das Zielmolekül ein Polypeptid ist.

7. Verfahren nach Anspruch 5, das des weiteren den Schritt der Bindung des markierten Zielmoleküls an einen zweiten Liganden vor Schritt a) umfaßt.

0866 967

03.03.00

1/10

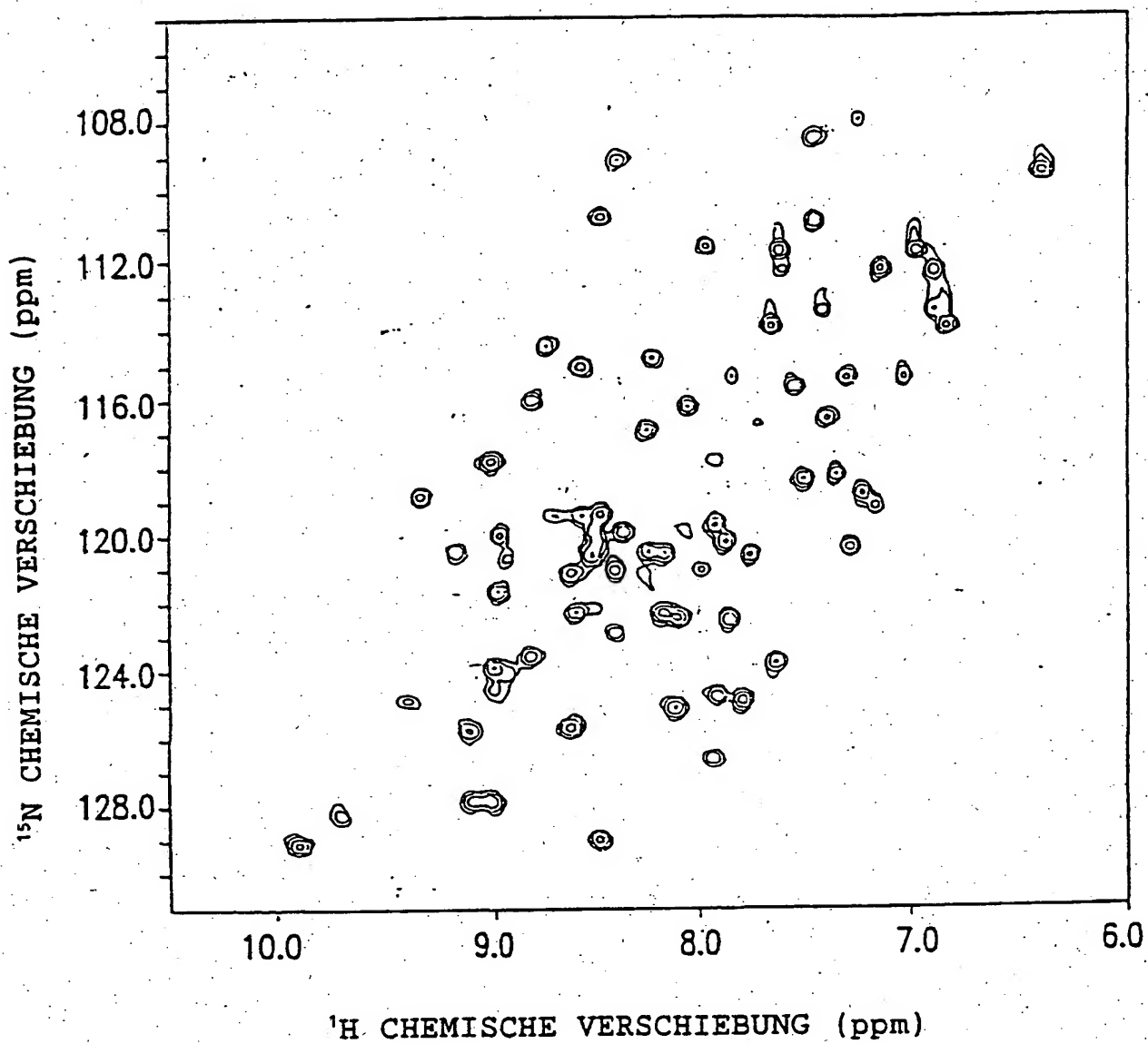


FIG.1

03.03.00

2/10

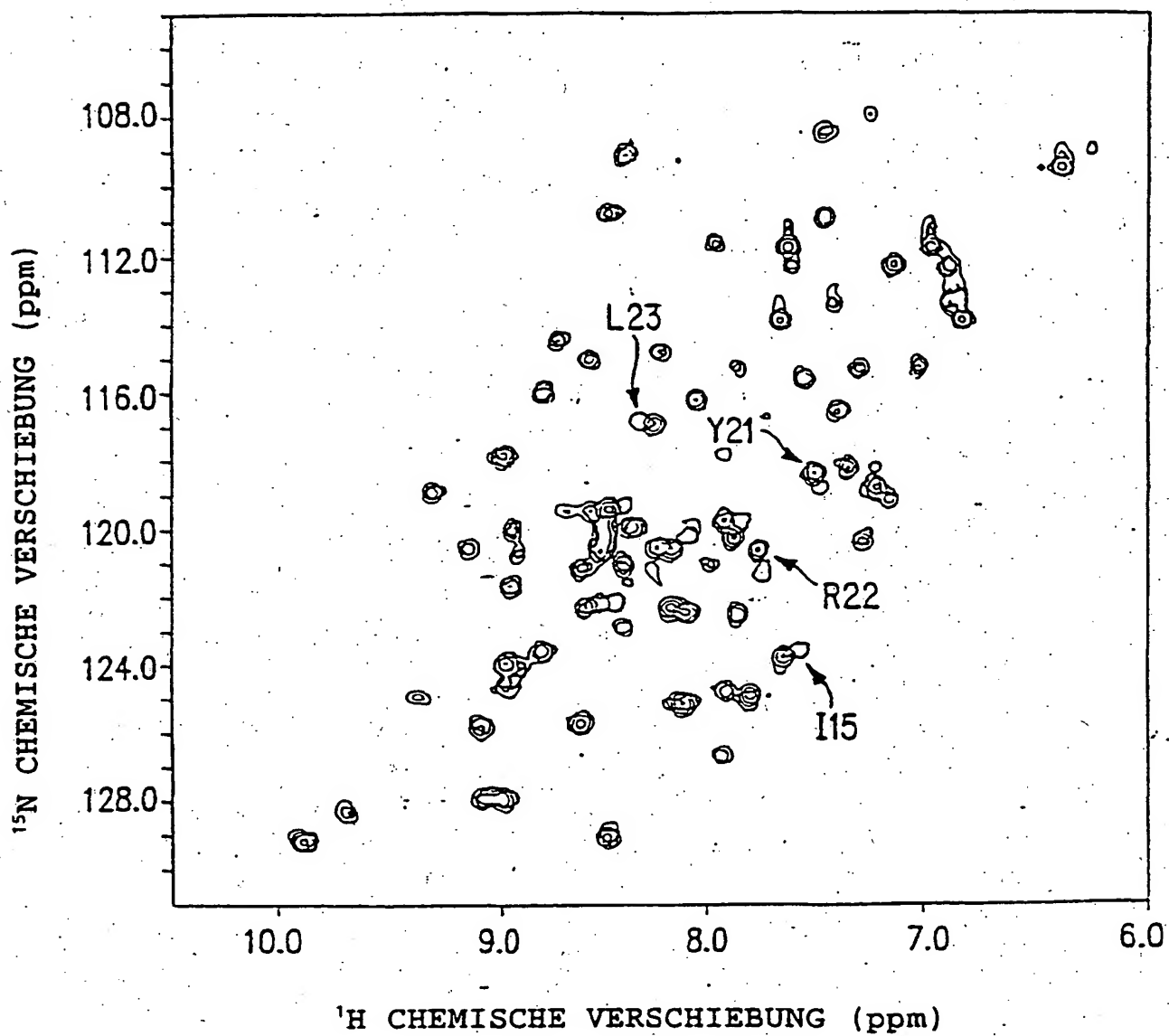


FIG.2

03.03.00

3/10

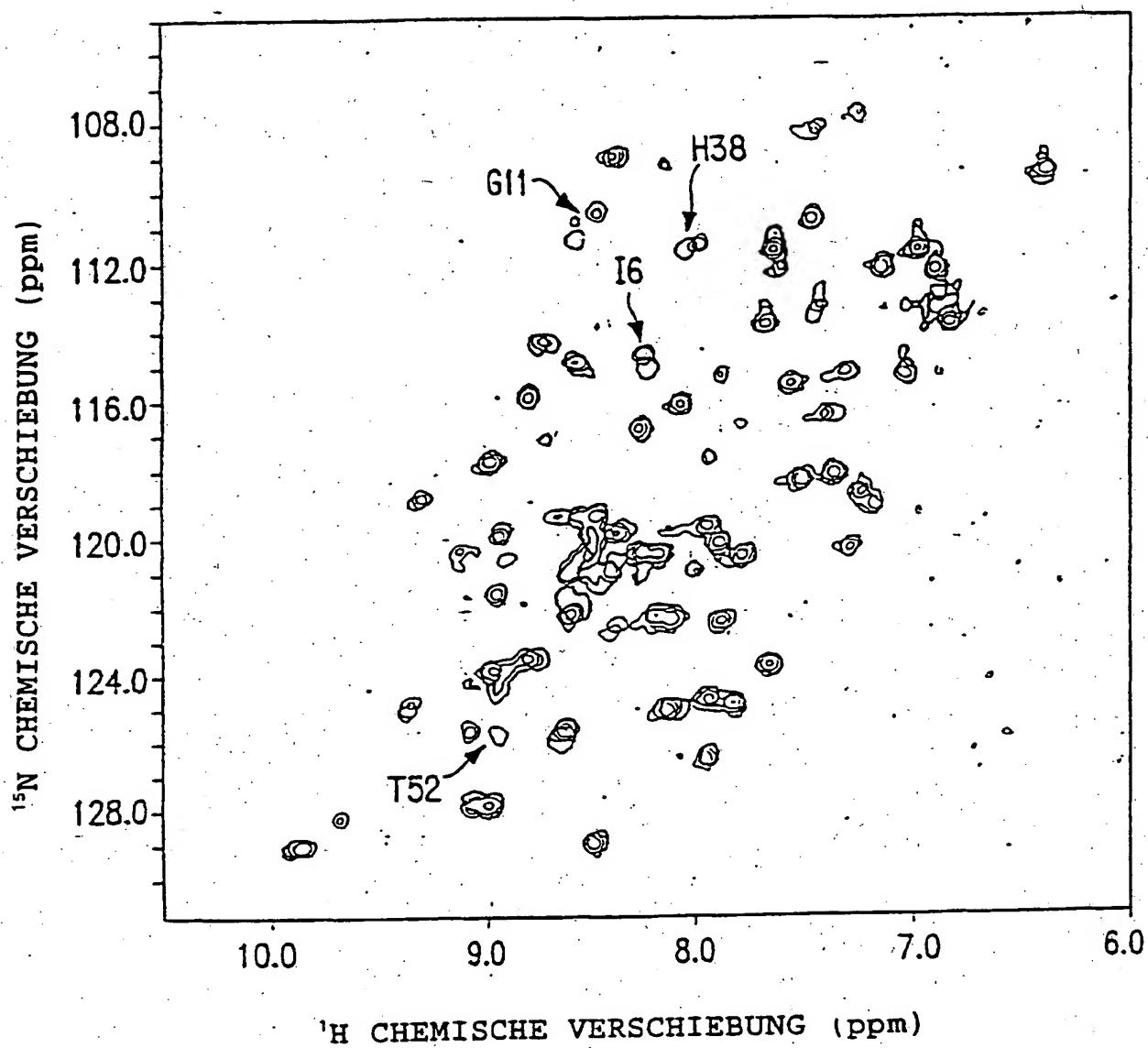


FIG.3

03.03.00

4/10

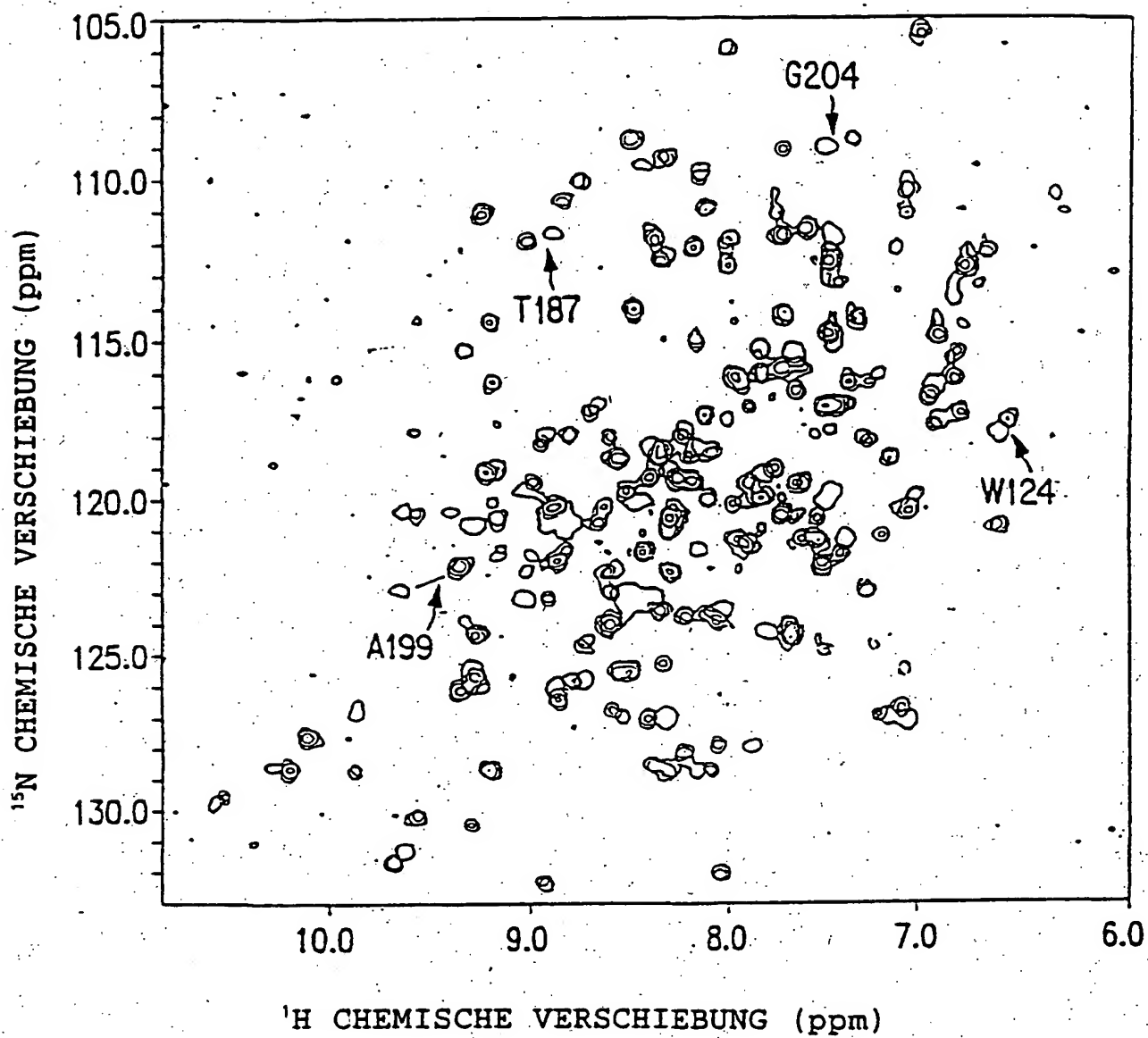


FIG.4

03.03.00

5/10

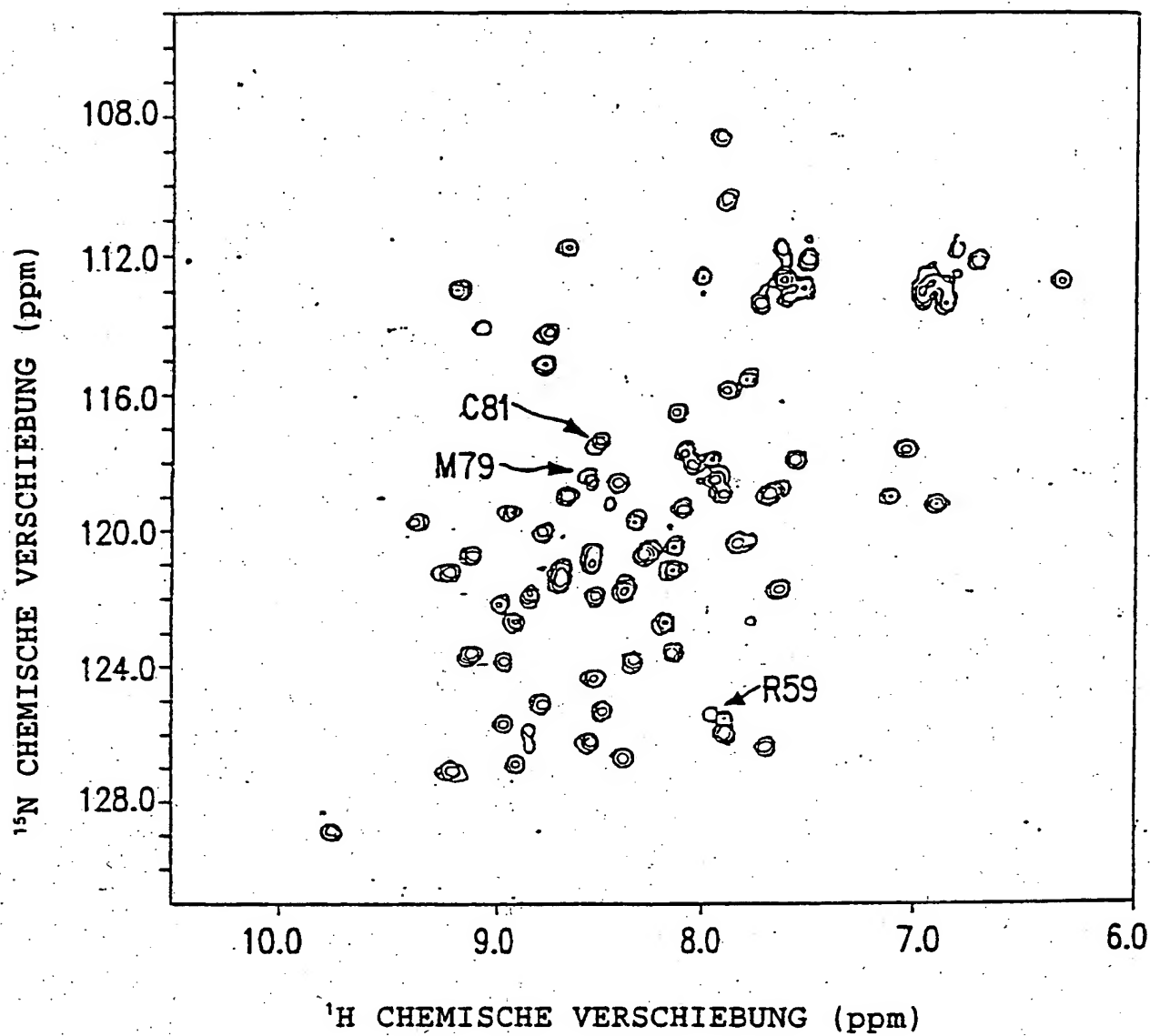


FIG.5

03:03:00

6/10

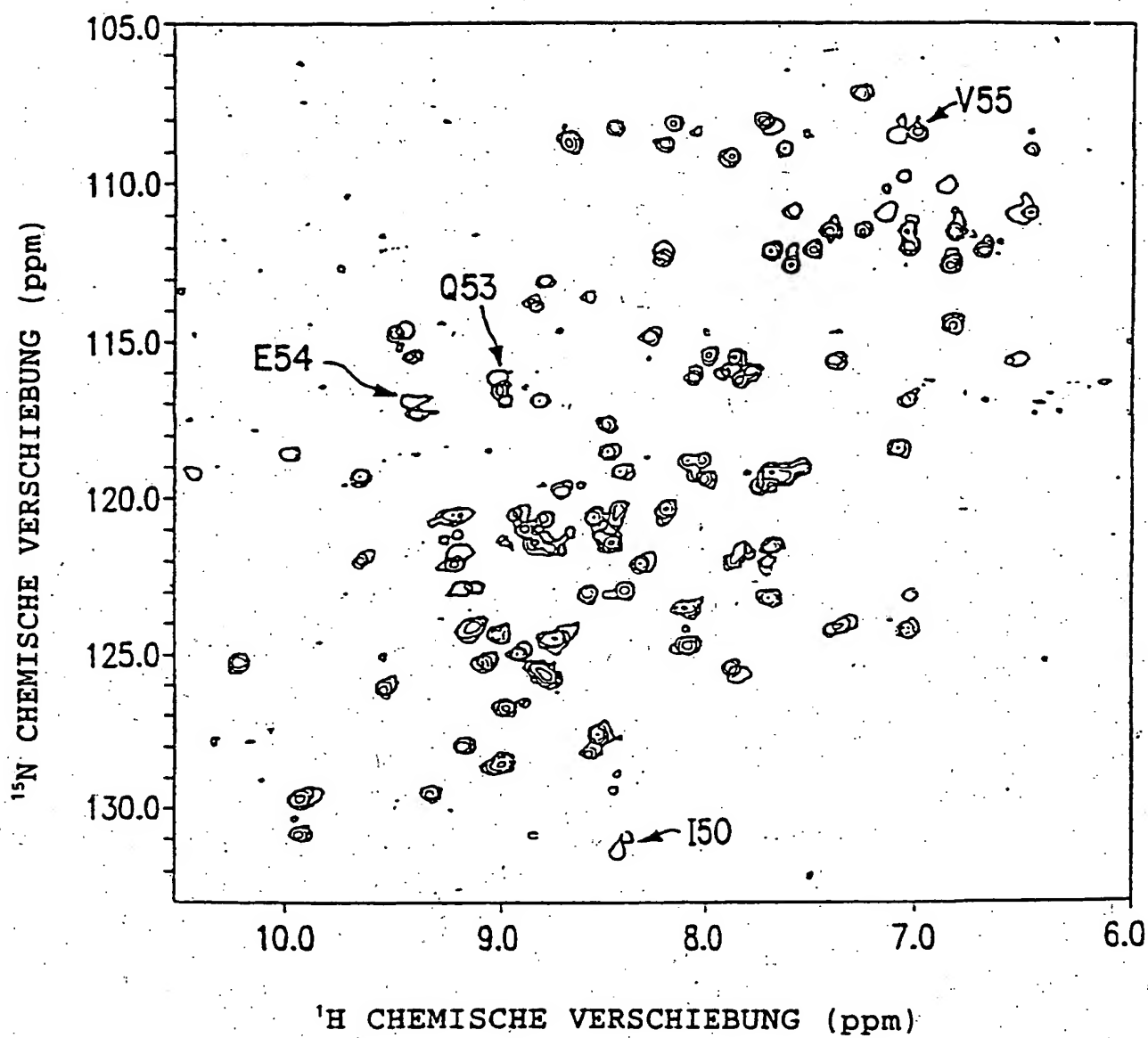


FIG.6

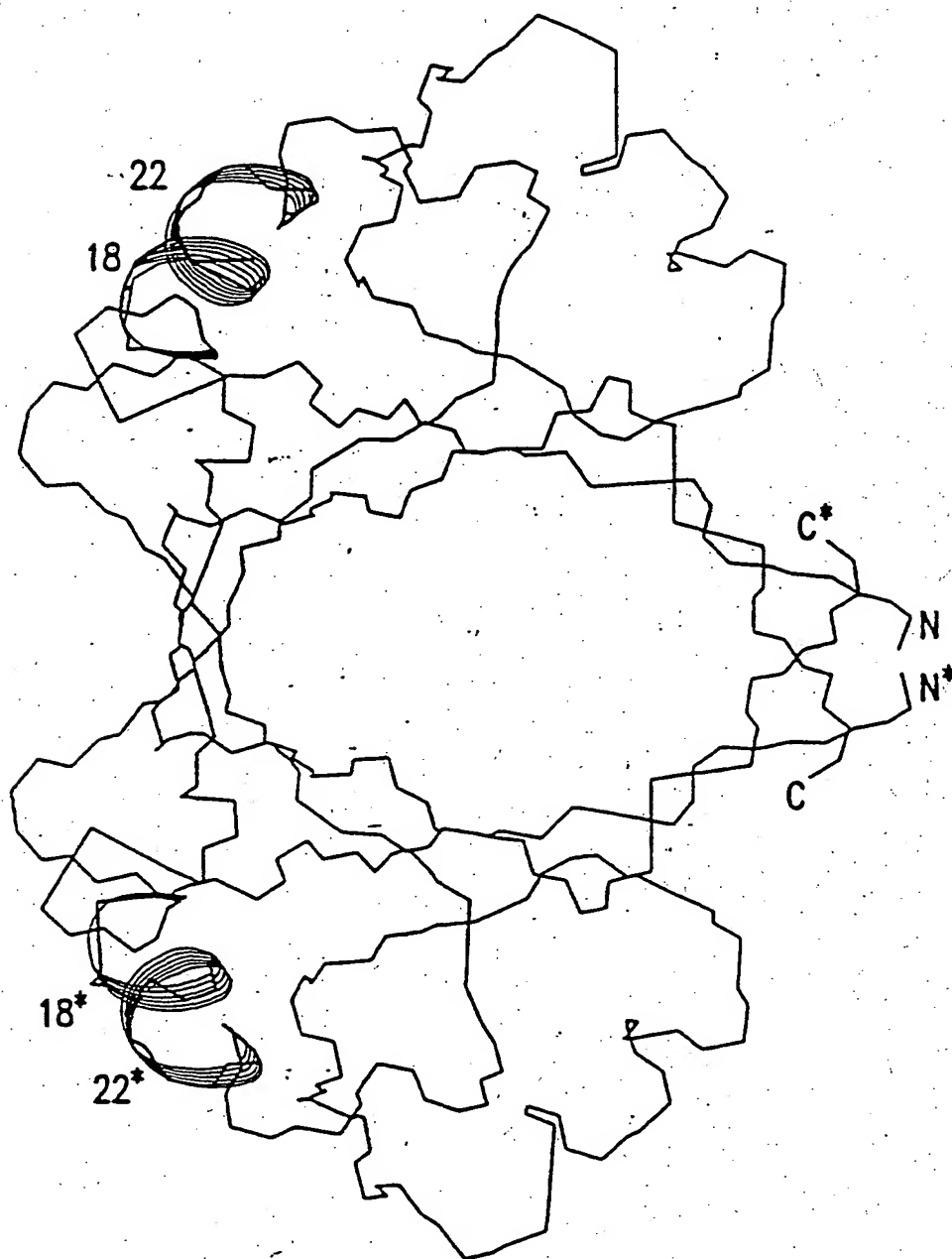


FIG.7

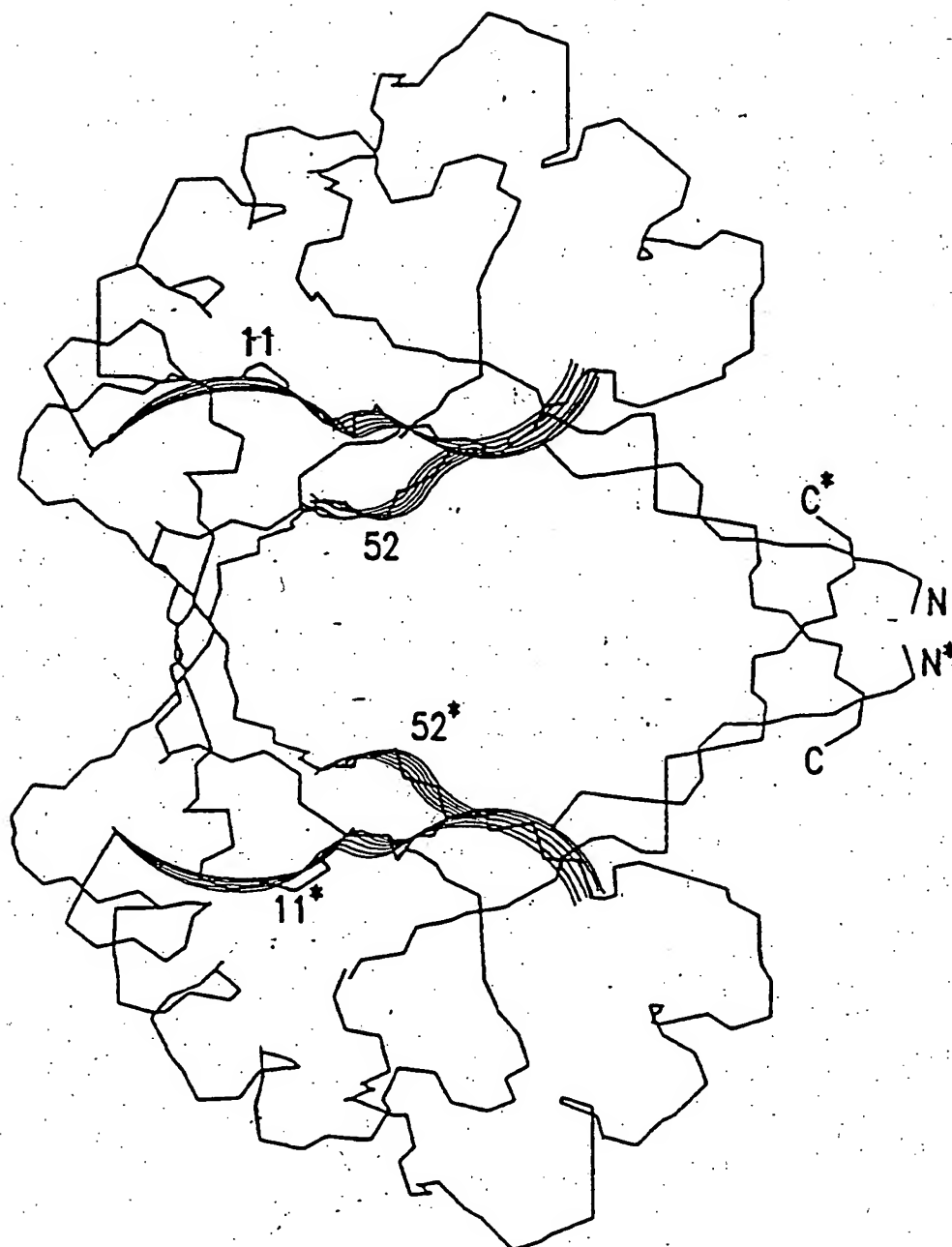


FIG.8

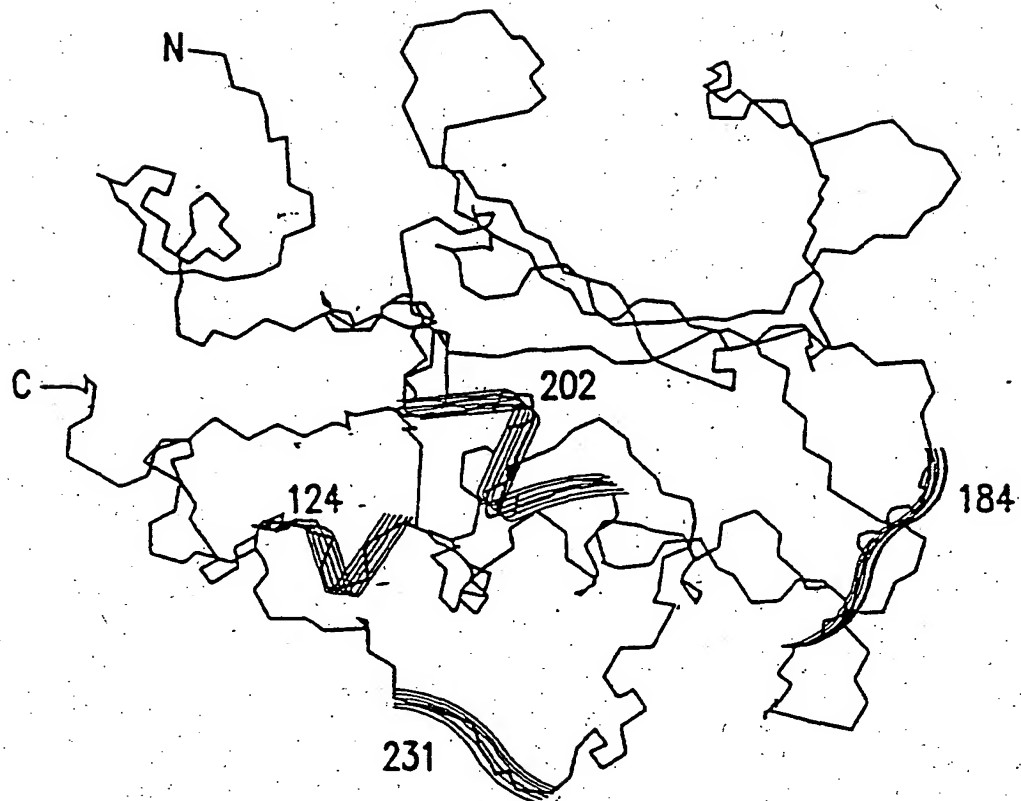


FIG.9

03.03.00

10/10

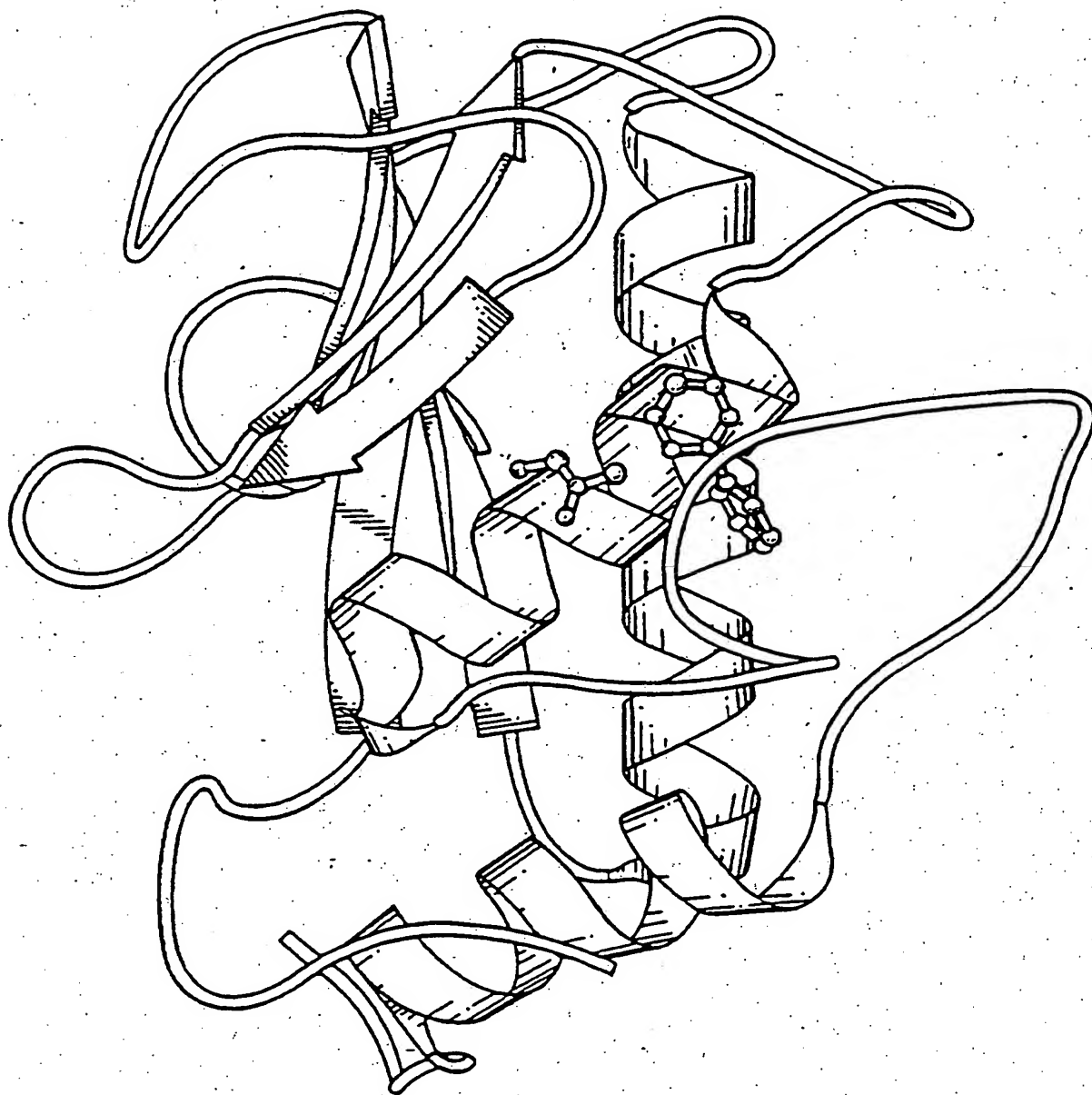


FIG.10

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**